

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANA APARECIDA DE OLIVEIRA PEREIRA LYRA

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, URÉIA, CÁLCIO E FÓSFORO EM
SALIVA TOTAL ESTIMULADA DE DEPENDENTES QUÍMICOS EM
DESINTOXICAÇÃO

CURITIBA
2014

LUCIANA APARECIDA DE OLIVEIRA PEREIRA LYRA

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, URÉIA, CÁLCIO E FÓSFORO EM
SALIVA TOTAL ESTIMULADA DE DEPENDENTES QUÍMICOS EM
DESINTOXICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Odontologia, Setor de Ciências
da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Jose Miguel Amenábar

CURITIBA
2014

AGRADECIMENTOS

À Deus pela luz, saúde e serenidade conservadas ao longo dessa jornada.

À Universidade Federal do Paraná e todos os professores do programa de Pós graduação em Odontologia.

Ao meu orientador Professor Jose Miguel Amenábar, agradeço sua incansável dedicação, o diálogo sincero e amigo, a direção sempre correta nos caminhos da pesquisa e sua inteligência admirável na solução dos problemas.

Ao professor Antonio Adilson de Lima, pela disponibilidade das amostras para este estudo e sua atenção especial em suas aulas sempre marcantes por conhecimento abundante. Agradeço seus comentários e sugestões na qualificação deste trabalho.

À professora Elaine Benelli pelas considerações na qualificação para enriquecer o conteúdo do trabalho.

Aos colegas do Mestrado; amizade, companheirismo, carinho e trocas de experiências relevantes para a continuidade da caminhada rumo ao constante conhecimento. Obrigada, Felipe, Laura e Mari pela imensa gentileza de vocês.

Aos meus pais, Gilberto Pereira Lyra e Maria Terezinha de Oliveira Lyra, sempre o incentivo amoroso para não desistir e não esmorecer diante das dificuldades.

Ao meu querido marido Marco Antônio, serei eternamente grata pela solidariedade, compreensão, afeto e principalmente a paciência pela minha ausência de muitas horas.

À Capes agradeço o apoio à pesquisa e suporte financeiro ao longo do curso.

RESUMO

O consumo abusivo de drogas pode alterar a composição salivar do usuário contribuindo para o desequilíbrio de sua saúde bucal. O objetivo deste estudo foi investigar as modificações de alguns parâmetros salivares em dependentes químicos (DQ), usuários de drogas como álcool, cocaína, crack e/ou maconha. Um total de cinquenta e quatro amostras salivares foram coletadas, sendo vinte e sete amostras de DQ com média de idade de 37 (± 10) anos, em tratamento para desintoxicação, provenientes do Instituto de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo (IPTA-Campo Largo-PR); e vinte e sete amostras salivares de indivíduos não dependentes químicos (NDQ) com média de idade de 38 (± 11) anos, provenientes da Academia Policial Militar do Guatupê (Curitiba, PR). As amostras salivares foram submetidas à análise bioquímica em duplicata para cada variável. A verificação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford e as concentrações de uréia, cálcio e fósforo salivar foram verificadas com kits colorimétricos específicos para cada elemento. O teste *t de Student* ($p < 0,05$) foi aplicado para comparar os parâmetros salivares dos grupos e o nível de significância foi 5%. Os resultados mostraram que as concentrações de proteínas totais, cálcio e fósforo foram maiores nos DQ. O fluxo salivar estimulado e a concentração de uréia não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Baseado nos resultados deste estudo, é possível sugerir que DQ em tratamento de desintoxicação, apresentam aumento na concentração de proteínas totais, cálcio e fósforo salivar, porém, não há diferença significativa no fluxo salivar e na concentração de uréia comparado aos NDQ.

Palavras-chave: Álcool, Cocaína, Crack, Maconha, Saliva, Usuários de drogas

ABSTRACT

The abusive consumption of drugs may alter the salivary composition of addict person leading to the unbalance of their mouth health. The aim of this study was to investigate alterations of some salivary parameters in chemical dependents, drug users (DU) such as alcohol, cocaine, crack and/or cannabis. A total of fifty-four salivary samples were collected, of these twenty-seven from drug users, at average age of 37 (\pm 10) years, undergoing desintoxication treatment, from the Institute of Alcoholism Research and Treatment (IPTA, Campo Largo-PR); and twenty-seven salivary samples from non-chemical dependent subjects, at average age of 38 (\pm 11) years from the Military Police Academy of Guatupê (Curitiba-PR). The saliva samples were submitted to the biochemical analysis in duplicate for each variable. The verification of the total protein concentration was performed using the Bradford method and the urea, calcium and salivary phosphorus concentrations were determined with specific colorimetrics kits for each element. The Student t test ($p < 0.05$) was applied to compare the salivary parameters of the groups and the significance level was 5 %. The results showed that the total protein, calcium and phosphorus concentrations were higher in the chemical dependent group. The stimulated salivary flow rate and the urea concentration did not show a significant difference ($p > 0.05$). Based on the results of this study, it is possible to suggest that DU undergoing desintoxication treatment, show an increase in the total protein, calcium and salivary phosphorus concentrations. There is, however, no significant difference in the salivary flow rate and the urea concentration compared to no chemical dependent group (NDU).

Keywords: Alcohol, Cocaine, Crack, Cannabis, Saliva, Drug Users

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	CÉLULA ACINAR.....	27
FIGURA 2-	ADENÔMERO DE GLÂNDULA SALIVAR.....	28
FIGURA 3 -	MATERIAL USADO NA COLETA DA SALIVA.....	41
FIGURA 4 -	COLETA DA SALIVA.....	42
FIGURA 5 -	COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS.....	43
TABELA 2	VALORES MÉDIOS DE FLUXO SALIVAR ESTIMULADO, PROTEÍNAS TOTAIS, URÉIA, CÁCIO E FÓSFORO EM DEPENDENTE QUÍMICO E NÃO DEPENDENTE QUÍMICO.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

DQ	Dependente químico
NDQ	Não Dependente Químico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OBID	Observatório Brasileiro de Informações sobre Drogas
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
SENAD	Secretaria Nacional de Política sobre Drogas
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SNPS	Sistema Nervoso Parassimpático
DU	Drug Users
NDU	Non Drug Users
OMS	Organização Mundial de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
HSBC	Health Behaviour in School-Aged Children
UNODC	United Nations Office on Drug and Crime
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
FSTE	Fluxo Salivar Total Estimulado
PTS	Proteína Total Salivar
Ca	Cálcio
P	Fósforo
THC	9-delta-tetrahidrocanabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 DROGAS	11
2.2 ÁLCOOL E ALCOOLISMO	12
2.3 COCAÍNA	15
2.4 CRACK	18
2.5 MACONHA	20
2.6 SALIVA E COMPOSIÇÃO	22
2.6.1 Funções Da Saliva	23
2.6.2 Fisiologia e Controle Salivar	24
2.6.3 Saliva como método diagnóstico	28
2.7 CÁLCIO	30
2.7.1 Cálcio na fisiologia humana	30
2.8 FÓSFORO	31
2.8.1 O Fósforo na Fisiologia Humana	32
2.9 PROTEÍNAS	33
2.10 URÉIA	35
2.11 INTER-RELAÇÃO DO ABUSO DE DROGAS E PARÂMETROS SALIVARES EM DEPENDENTES QUÍMICOS	36
3 PROPOSIÇÃO	37
3.1 OBJETIVO GERAL:	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	38
4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA	38
4.3 LINHA DE PESQUISA:	38
4.4 AMOSTRA / POPULAÇÃO	38
4.5 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE NO GRUPO DE ESTUDO	39
4.5.1 Critérios de inclusão	39
4.5.2 Critérios de exclusão	39
4.6 COLETA DE DADOS:	40

4.7	COLETA DA SALIVA.....	40
4.8	AVALIAÇÃO SIALOQUÍMICA.....	42
4.8.1	Determinação de Proteínas Totais	43
4.8.2	Determinação De Uréia Salivar:	44
4.8.3	Determinação de Cálcio Salivar.....	44
4.8.4	Determinação Do Fósforo Salivar:	45
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	46
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICES	75
	ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde droga é qualquer substância não produzida pelo organismo capaz de atuar sobre um ou mais de seus sistemas alterando seu funcionamento (CARLINI, 2011). Drogas de abuso são substâncias químicas administradas com o objetivo de obter efeito psicoativo, sem indicação terapêutica ou orientação médica promovendo a dependência química no usuário. O consumo abusivo de substâncias psicoativas como a cocaína, crack, maconha e o álcool tornou-se crescente, sendo um problema de saúde pública (LIMA; SILVA 2007; UHART; WAND, 2009).

Dependência química é uma doença cerebral crônica e recidivante causada pelo uso frequente e/ou abusivo de substâncias psicoativas resultando em efeitos deletérios neurológicos e fisiológicos. As múltiplas necessidades psicossociais dos usuários de drogas ilícitas comprometem suas vidas com igual intensidade (KALIVAS; VOLKOW, 2005). A redução ou suspensão da substância psicoativa, pode iniciar sinais e sintomas desconfortáveis caracterizando a síndrome de abstinência (OMS, 2013). A síndrome de abstinência é atualmente definida pelo CID 10 (OMS, 2013) como “um conjunto de sintomas, de agrupamento e gravidade variáveis, ocorrendo em abstinência absoluta ou relativa de uma substância, após uso repetido e usualmente prolongado e/ou uso de altas doses daquela substância. O início e curso do estado de abstinência são limitados no tempo e relacionados ao tipo de substância e a dose que vinha sendo utilizada imediatamente antes da abstinência. O estado de abstinência pode ser complicado por convulsões, vômitos e febre alta. (OBID, 2011).

É possível que usuários crônicos de álcool e de drogas ilícitas possam apresentar alterações relevantes no volume e na composição do fluído salivar (HU, 2008). A secreção das glândulas salivares é controlada pelo Sistema Parassimpático e Simpático, simultaneamente (CARPENTER, 2013). A composição salivar do indivíduo é influenciada por estímulos gustatórios, mecânicos, nervosos e endocrinológicos. A presença de inflamação, acúmulo de placa aderidos à superfície dental e gengival, uso contínuo de medicamentos são alguns dos fatores locais que interferem na composição da saliva total (CHAUDHARI; ROPER, 2010).

Os componentes orgânicos da saliva como proteínas, uréia, aminoácidos e os componentes inorgânicos como cálcio, fosfato, potássio, bicarbonato podem sofrer mudanças em suas concentrações normais devido ao abuso de substâncias psicoativas (ENBERG, 2001; WAZKIEWICZ, 2013). Os efeitos resultantes à partir do estímulo dos neuroceptores presentes nas paredes das células das glândulas salivares determinam as características da composição e volume do fluído salivar (DOUGLAS, 1999). A estimulação nervosa parassimpática e simpática atua especificamente na porção basal das membranas das células acinares, modificando a permeabilidade a certos íons. A duração, intensidade e frequência do estímulo determina a característica da secreção salivar (AIRES, 2008; CARPENTER, PROCTOR, 2007). A hipótese da secreção salivar em dependentes químicos apresentar modificações em sua composição e volume pelos estímulos atuantes sobre a inervação parassimpática e simpática foi levantada neste estudo.

O usuário de drogas têm alto potencial para alterações da resposta imune bucal devido à escassa higiene geral e das mucosas orais (SHETTY, 2010; ANTONIAZZI, 2013). Os processos inflamatórios que envolvem tecido gengival e ósseo são capazes de desencadear alterações na secreção salivar e nos mecanismos de defesa do indivíduo, estimulando alta prevalência de lesões e doenças relacionadas (D'AMORE *et al.*, 2011; COLODEL *et al.*, 2008). Essa condição pode causar distúrbios na homeostasia dos componentes químicos salivares responsáveis pela integridade dos tecidos da mucosa bucal (FONSECA, 2009), principalmente aquele com pouca higiene bucal, característica peculiar do dependente químico (SANCHEZ, 2013; REDDY, 2012). O objetivo deste estudo foi investigar a concentração de cinco parâmetros salivares (proteínas totais, uréia, cálcio, fósforo e fluxo salivar) em dependentes químicos e comparar com não dependentes químicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DROGAS

De acordo com a *United Nations Office on Drug and Crime* (UNODC), o número de dependentes químicos em 2011 era de aproximadamente 272 milhões, 3,3% da população mundial (UNODC, 2011; GUPTA *et al.*, 2012). O uso excessivo de álcool e drogas psicoativas traz consequências graves para a saúde pública por causar prejuízos irreparáveis no organismo do indivíduo, dificultando sua vida social, econômica e cultural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Um estudo realizado por Anderson e Ferrow (1998) em centros de detenção permanente apontou os problemas de saúde mais recorrentes entre adolescentes dependentes químicos nas visitas ao centro médico das instituições. Esses autores relataram que os motivos das consultas foram: problemas bucais/dentais (65,9%), transtornos psiquiátricos (44,9%), afecções dermatológicas (44,1%) e respiratórias (35,6%).

No estudo de revisão sistemática realizado por Degenhardt e Hall (2012) foram avaliados os efeitos adversos à saúde provocados pelo consumo de drogas. Os resultados mostraram que os mais prevalentes são: overdose e suas consequências, doenças cardiovasculares, cirrose, hepatite B, hepatite C e doenças mentais.

As drogas psicoativas fazem parte da história da humanidade. Os últimos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013) revelaram que 22% de jovens menores de 18 anos já usaram ou ainda fazem uso de drogas ilícitas. Em 2005, um estudo realizado pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD) em parceria com o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) e o Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) envolvendo as 108 maiores cidades brasileiras, apontou o álcool como maior responsável na estimativa de mortes associada ao consumo de drogas, seguido de maconha e cocaína (OBID, 2011). A associação entre abuso do álcool e dependência de cocaína é frequente, além do consumo crescente do uso

combinado de drogas. Estima-se que entre 60 a 90% dos dependentes de cocaína tenham diagnóstico de abuso ou dependência de álcool (FERREIRA, 2003).

Os mecanismos neurobiológicos da dependência química são complexos causando distúrbios em áreas cerebrais. Os efeitos de recompensa como alívio de tensões, sensação agradável do humor e aumento da percepção surgem pela ativação da via dopaminérgica mesocorticolímbica com corpos celulares localizados na área tegmental ventral e se projetam no núcleo *accumbens*, tubérculo olfatório, córtex frontal, amígdala e área septal. O efeito prazeroso é transitório e o organismo passa a experimentar sensações desagradáveis pela redução de dopamina e ativação de mecanismos de compensação (GARRET; GRISHAN, 1995).

Os riscos associados ao uso de diferentes combinações de drogas são influenciados por características do usuário, como a existência de tolerância, estado de saúde, aspectos genéticos e fenotípicos (MANDEL, 1980).

Em relação à saúde bucal, SAINI, GUPTA e PRABHAT (2013) afirmaram que usuários de substâncias psicoativas têm saúde bucal ruim devido à negligência nos cuidados com a higiene bucal e ressaltam a relação direta com doenças dentárias, periodontais e sistêmicas.

Segundo Carlini (2011), as drogas psicoativas ou psicotrópicas são classificadas como:

- a) Depressoras (ex: álcool);
- b) Estimulantes (ex: cocaína, crack);
- c) Perturbadoras (ex: maconha).

2.2 ÁLCOOL E ALCOOLISMO

Registros arqueológicos revelam que o consumo de bebidas alcoólicas pelo ser humano datam de aproximadamente 6000 anos a.C. A partir da Revolução Industrial, a produção e consumo deste tipo de bebida aumentou em grande proporção, conseqüentemente gerando uma população expressiva com problemas relacionados ao abuso desse tipo de bebida (CEBRID, 2011).

O álcool ou etanol é um depressor do SNC e está presente com frequência nas combinações de drogas (GRIFFTHIS *et al*, 2012; SWENDSEN *et al*, 2010). A

ampla disponibilidade do etanol facilita o acesso ao uso de outras drogas, sobretudo em contextos recreativos (CARLINI, 2005; GOSSOP *et al.*, 2006). O consumo de bebida alcoólica é um dos principais fatores de risco para a saúde no mundo e está envolvido em mais de 60 diferentes causas de problemas de saúde, constituindo relevante preocupação à sociedade (PATTON *et al.*, 2009; RHEM *et al.*, 2009).

O número de internações por álcool no Brasil foi de 48.506 internações e por outras drogas foi de 48.722 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). No estado do Paraná, o número de internações por bebidas alcoólicas e por outras drogas foi de 6.360 e 5.599, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O etanol apresenta baixo peso molecular (< 100 daltons), o que favorece sua passagem através da membrana celular por difusão passiva que é o mecanismo dominante (UNDCP, 2011). O etanol age em receptores GABA (ácido-gama aminobutírico) do subtipo A. Essa ativação gabaérgica abre canais de cloreto acoplados a receptores GABA A e inibe canais de cálcio, dependentes de voltagem nos neurônios. Ocorre inibição de receptores de NMDA (glutamato N-metil-D-aspartato), que são seletivos aos íons sódio e cálcio, responsáveis pela despolarização celular (FLEMMING *et al.*, 2003). O uso agudo de álcool reduz o glutamato no córtex e no cerebelo, inibindo o fluxo iônico mediado por receptores NMDA. A ação adrenérgica do etanol ocorre pelo aumento da síntese e liberação de noradrenalina. Porém, há diminuição da sensibilidade pós-sináptica com redução da resposta do AMP cíclico à noradrenalina, que é uma ação importante na tolerância ao álcool (SCIVOLETTO, MALBERGIER, 2003). A ingestão de bebida alcoólica aumenta a secreção salivar temporariamente devido ao gosto ácido e reflexo condicionado (NEIDLE, YAGELA *et al.*, 2011). As elevadas doses de álcool reduzem a salivação, retardando a absorção intestinal de glicose, aminoácidos, ácido fólico, tiamina e vitamina B12. O metabólito do álcool, o acetaldeído, causa maior liberação de catecolaminas, desencadeando taquicardia e aumento da pressão sanguínea arterial. Quando ingerido em excesso e a longo prazo, aumenta os riscos de hipertensão e efeitos cardíacos adversos, como a cardiomiopatia (NEIDLE, YAGELA *et al.*, 2011; GOSSOP *et al.*, 2006). O álcool pode alterar o desenvolvimento do cérebro em adolescentes, influenciando negativamente o desenvolvimento cognitivo, emocional e social (TAPERT *et al.*, 2004).

Carlini (2005), Gossop *et al.* (2006) afirmam em seus estudos que o álcool atenua a hiperatividade causada pela intoxicação por cocaína, induzindo muitos

usuários ao uso crônico. A combinação pode aumentar a ativação de mecanismos de recompensa cerebral, alterando a relação entre efeitos aversivos e de recompensa, o que resulta em maior necessidade do uso concomitante (BUSSE, 2004; KNACKSTEDT, 2005).

Segundo Gossop (2006) e Hatitaskos (1999) as características clínicas mais frequentes da dependência físico-química do álcool são: desenvolvimento e aumento da tolerância; relevância da presença diária do álcool para o indivíduo relacionada à necessidade do “grande desejo” de beber; ausência da percepção do auto limite; síndrome de abstinência e aumento da ingestão de álcool para aliviar os sintomas desta síndrome.

A síndrome de abstinência alcoólica é um quadro que aparece pela redução ou interrupção imediata da ingestão de bebidas alcoólicas, após um período de consumo crônico e ocorre de forma ordenada, progressiva e aparente (MASTERS, 2003). A síndrome tem início de 6 a 8 horas após interrupção da ingestão de álcool, reconhecida por tremores das mãos, acompanhada de distúrbios gastrintestinais (náuseas, vômito, diarreia), sudorese, febre, distúrbios do sono e estado de inquietação geral (abstinência leve). Cerca de 5% dos que entram em abstinência leve evoluem para a síndrome de abstinência grave ou *delirium tremens* que, além da acentuação dos sinais e sintomas anteriormente referidos, se caracteriza por tremores generalizados, agitação intensa e desorientação no tempo e no espaço (CHOU *et al.* 2012). Em alcoólatras, desidratação e desnutrição são comuns devido à frequente substituição do alimento pela bebida alcoólica, reabsorção e digestão deficientes devido ao aumentado catabolismo protéico. A resposta imunológica pode se apresentar prejudicada frente à infecções bucais (BIKLE, 1993). O abuso do álcool prejudica a função dos neutrófilos, aumenta os níveis de citocinas inflamatórias no fluído crevicular gengival, contribui para o crescimento e infiltração bacteriana no periodonto, produzindo efeito tóxico gengival. Os principais efeitos prejudiciais observados nos dentes são erosão química, abrasão, cáries cervicais e/ou perdas dentárias (REDDY, 2012). Estudo de Harrys (2002) relata que indivíduos que abusam simultaneamente de álcool e outras drogas tiveram maior índice de dentes cariados, perdidos e restaurados comparado ao grupo dependente exclusivamente com álcool. Traebert e Moreira (2001) constataram alta prevalência de erosão e cárie dental em alcoólatras. Neste estudo, 67% dos pacientes apresentavam doença periodontal e 12% apresentaram pH ácido bucal. Os autores

afirmam que um ambiente bucal constantemente ácido ($\text{pH} \leq 4$) pode favorecer erosão química e cárie dental, atribuído à dissolução de hidroxiapatita e baixo potencial para remineralização do esmalte dentário (BUZALAF, 2011). Os alcoólatras geralmente apresentam higiene bucal ruim devido à negligência com cuidado pessoal e visitas ao dentista. Essa condição pode explicar os elevados índices de perdas dentárias, cáries, restaurações defeituosas e situação periodontal desfavorável (DURIK *et al.*, 2013; HARRYSS, 2002; DASANAYAKE, 2010). Tezal *et al.* (2004) realizaram um estudo transversal com 13.198 consumidores crônicos de álcool para avaliar os efeitos do consumo do álcool e doença periodontal. Os resultados mostraram maior severidade da doença periodontal de acordo com a dose-dependência. Estudos similares apresentaram resultados que corroboram os citados acima (DASANAYAKE *et al.*, 2010; D'AMORE *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2009; SAINI, GUPTA, 2013). O etanol é um fator de risco para desenvolvimento da periodontite (AMARAL *et al.*, 2009).

A pesquisa de Griffiths *et al.* (2012) afirma que adultos jovens (15-34 anos) consumidores crônicos de álcool tinham duas a seis vezes mais chance de associar o uso de *cannabis* e duas a nove vezes maior chance de associação com uso da cocaína quando comparados com a população geral. Outro estudo realizado pelo IBGE (PENSE, 2012) mostra o consumo de bebida alcoólica entre os escolares (15-19 anos). A pesquisa aponta taxa de 26,1% escolares no Brasil e não apresenta diferenças relevantes entre os sexos masculino (25,2%) e feminino (26,9%). Entre os alunos de escolas privadas e públicas, este indicador foi respectivamente de 23% e 26,7%. As capitais com os maiores percentuais de escolares que consumiram bebida alcoólica no período considerado, foram Porto Alegre (34,6%) e Florianópolis (34,1%), enquanto os menores percentuais foram registrados em Belém (17,3%) e Fortaleza (17,4%).

2.3 COCAÍNA

É um alcalóide extraído das folhas da planta *Erythroxylum coca*, oriunda da América do Sul. É um potente anestésico local e potente estimulante do SNC (SOUZA, 2007). O efeito estimulante ocorre nas sinapses dopaminérgicas e noradrenérgicas do usuário, conferindo uma sensação de vigor e euforia, alerta e

autoconfiança aumentados e diminuição do apetite. É uma droga simpatomimética de ação indireta, pois atua em diversas vias de neurotransmissão e não possui receptores específicos. A cocaína exacerba funções neuronais já estabelecidas (DACKIS, O' BRIEN, 2001) por resultar em efeitos periféricos que mimetizam a ativação da divisão do sistema nervoso simpático (BEAR *et al.*, 2002, 2010). O início do efeito é rápido; dez a quinze segundos os primeiros efeitos são percebidos pelo usuário. O consumo de bebidas alcoólicas associado à cocaína produz consequências graves, devido ao álcool aumentar a necessidade do maior consumo da cocaína, potencializando o risco de morte súbita (OBID, 2011; GOSSOP *et al.*, 2006). A cocaína, além de inibir a recaptação da dopamina, é capaz de ação semelhante com outros neurotransmissores centrais, tais como a serotonina e a noradrenalina (ZIEDONIS, KOSTER, 1991). Estudos demonstram diminuição de disparos neuronais no núcleo dorsal da rafe após a administração aguda de cocaína (DACKIS, O' BRIEN, 2001). Há estudos controversos quanto a concentração do metabólito serotoninérgico, ácido 5-hidroxiindolacético, no uso crônico: tanto decréscimo quanto aumento (LITTLE *et al.*, 1996). Estudos pré-clínicos sugerem que a integridade do sistema serotoninérgico é fundamental para o aparecimento do abuso e dependência da cocaína (ZIEDONIS, KOSTER, 1991).

O aumento da concentração sináptica da dopamina não produz exclusivamente sintomas de euforia ou reforço à gratificação. Associada à noradrenalina, a dopamina ativa o sistema nervoso simpático, levando a efeitos tais como vasoconstrição e aumento da frequência cardíaca e arterial (GOLD, 1993). A cocaína provoca sobrecarga de catecolaminas na fenda sináptica. Com o uso crônico, a hipersensibilidade pós-sináptica de seus receptores intensifica a ação do sistema nervoso simpático sobre os órgãos por ele inervados. A cocaína estimula a gratificação e o uso continuado ligando-se aos transportadores dopaminérgicos. Tal ligação bloqueia a recaptação da dopamina e aumenta a concentração, o tempo de permanência e a intensidade de ação da substância sobre os receptores pós-sinápticos (WEISS *et al.*, 1994).

A cocaína chega ao indivíduo sob a forma de um sal, o cloridrato de cocaína, que é solúvel em água. O modo de administração pode ser via nasal (aspirado), intravenoso (dissolvido em água) ou sob a forma de base, o crack, pouco solúvel em água porém volátil quando aquecido (CEBRID, 2011).

As consequências bucais ocorrem pela administração da droga via nasal e tópica na mucosa oral principalmente nos tecido gengivais (PARRY *et al.* 1996; KAPILA; KASHANI, 1997). Fazzi *et al.* (1996) afirmam que ulcerações, necrose gengival e atrofia tecidual decorrentes do efeito vasoconstritor promovido pela cocaína, quando em contato com a mucosa bucal, diminui a sensação dolorosa pelo poder anestésico da droga. A frequência do consumo estimula o aparecimento de inflamação gengival grave associada à dor aguda e necrose tecidual formando uma película esbranquiçada sobre a lesão. Atrição e erosão dental são achados comuns, principalmente em dentes anteriores (FRIEDLANDER, GORELICK, 1988). O estímulo ácido, causado pela droga, atua nos tecidos bucais, podendo causar interferência na capacidade tampão e precipitação de certas proteínas salivares e cálcio (ANTONIAZZI, 2013, DAWES, 1984). Estudo conduzido por Teixeira (2009) revelou níveis aumentados de cárie dentária e perdas dentais (média do CPO-D = 14,81), atribuindo o fato ao reduzido acesso à assistência odontológica, baixa autoestima desses indivíduos, higiene oral ruim e dieta frequente e rica em açúcar. Quanto à higiene oral, 94% dos usuários não utilizavam o fio dental e seus hábitos alimentares, indicavam maior consumo de doces, refrigerantes e café com açúcar. O desgaste dentário foi observado em 36,5% em indivíduos que apresentavam xerostomia e 32,7% relataram regurgitação (refluxo gastroesofágico). Puy (2006) atribui às drogas, a suscetibilidade aumentada do indivíduo à erosão dental. Scully (2003), afirma que não há dados relacionados entre o uso da cocaína e xerostomia, pois esta condição ocorre na associação com álcool ou tabaco. Usuários de cocaína/crack associam o uso de álcool para aliviar sintomas da intoxicação (BARRACO, 2008) e o desconforto da abstinência recente de cocaína (MAGURA, 2000). A associação com o álcool representa uma alta taxa de destruição dentária, dentes perdidos, doença periodontal e xerostomia (LEE *et al* 1991).

Shen *et al.* (1994) conduziram um estudo em ratos, observaram diminuição de algumas citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF α) por macrófagos peritoneais após injeção de cocaína intravenosa. Baldwin *et al.* (1997) observaram o comportamento induzido pela cocaína. Houve elevada atividade fagocítica de polimorfonucleares e aumento da produção de interleucina 8 (IL-8). Todas essas alterações imunológicas podem estar relacionadas com a patogênese da doença periodontal e possível diminuição das respostas imunes inata e adaptativa, influenciando sua progressão e severidade, se

presente em usuários de drogas, principalmente na associação com o etanol (REDDY *et al*, 2012).

2.4 CRACK

O uso de crack atinge pessoas em idades cada vez mais precoces, alastrando-se pelo Brasil e por todas as classes sociais, com facilidade de acesso e quase sempre antecedido do consumo de álcool e/ou tabaco (NOTO, 2006; DUALIBI, OLIVEIRA, 2008).

O crack é uma droga em forma sólida obtida a partir da cocaína em pó adicionada de água e um agente alcalinizante que pode ser hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio (WOOD *et al.*, 1996; DUALIBI *et al.*, 2008). A “pedra” de crack é acondicionada em aparatos como latas de alumínio, cachimbos e tubos onde é queimada como uma chama, transformando-se rapidamente para o estado líquido, depois gasoso. Neste momento é percebido um “estalo”, por isso a origem da denominação “crack” à droga (ANTONIAZZI *et al.*, 2013). O usuário inala a fumaça produzida a qual é absorvida pelas vias pulmonares e atinge a circulação cerebral em 6 a 8 segundos (WOOD, 1996; DUALIBI, OLIVEIRA, NAPPO, 2008). O rápido efeito da droga resulta em uma sensação de alegria, euforia, sensação de poder e aumento da autoestima no usuário. O uso crônico da droga evolui para prostração intensa, forte depressão e impotência sexual (MILROY, PARAI, 2011). A ação do crack sobre o sistema nervoso central provoca aceleração dos batimentos cardíacos, aumento da pressão arterial, dilatação das pupilas, suor intenso, tremores, excitação, maior aptidão física e mental. Os usuários podem apresentar problemas musculares (rabdomiólise), problemas respiratórios (congestão nasal, tosse, danos pulmonares), complicações cardiovasculares, neurológicas, gastrointestinais (náuseas e dor abdominal), perda do apetite (VASICA, TENNANT, 2002) e consequente perda de peso e desnutrição (DEVLIN, HENRY, 2008).

O uso crônico do crack contribui para o desenvolvimento de tolerância aos efeitos gerados pela droga, o que propicia o aumento das doses pelo usuário gerando comportamento agressivo, compulsivo e paranóico (KUO *et al.*, 2011). Usuários de cocaína/crack referem comumente uso de álcool para aliviar sintomas de intoxicação (BARRACO, 2008).

A gravidade do crack é maior porque a dependência química desenvolvida pelo usuário é rápida devido ao efeito imediato, porém sua duração é breve. Na boca, podem ser observadas queimaduras nos lábios, língua e garganta devido à forma de consumo da substância. O alto índice de soropositivos (HIV positivo) entre os usuários de crack está relacionado principalmente ao comportamento sexual, assim como hepatites B e C, herpes e outras transmissões infecciosas. Ao entrar em contato direto com a boca, há risco da fumaça danificar o esmalte dentário pela redução da capacidade tampão da saliva (estabilidade do pH da boca) facilitando a erosão dentária. Esse fato pode ser causado pelo ácido sulfúrico, o qual faz parte da composição química do crack, com o potencial de promover uma maior desmineralização no esmalte dentário. Redução no fluxo salivar e perdas dentárias foram observados em usuários de crack (ANTONIAZZI *et al.*, 2013). A perda da autoestima e mudanças no padrão comportamental influenciam o cuidado pessoal quanto à higiene geral e bucal desses indivíduos (ANTONIAZZI *et al.*, 2013; COLODEL *et al.*, 2009). A plausibilidade biológica sustentada para associação do uso do crack e problemas bucais está nas condições locais como calor e vasoconstrição gerados, trauma mecânico devido à fricção no tecido gengival e diminuição do fluxo salivar, além dos efeitos deletérios na resposta imunológica de seus usuários (MITCHELL, LEWIS *et al.*, 1994; SHEN *et al.*, 1994; BALDWIN *et al.*, 1997; PELLEGRINO, BAYER, 1998; CABRAL, 2006; WOYCEICHOSKI *et al.*, 2008; COLODEL *et al.*, 2009). A associação do uso do crack e alterações periodontais é fundamentada nas alterações das funções celulares e fatores associados ao sistema imune bucal (PELLEGRINO, BAYER, 1998; STEFANIDOU *et al.*, 2011). A capacidade de atividade fagocítica apresenta maior supressão após administração de crack (CABRAL, 2006). Ribeiro *et al.* (2002) demonstraram altos percentuais de biofilme bacteriano e sangramento gengival em usuários de crack. Lima *et al.* (2007) observaram mudanças inflamatórias e aumento da queratinização do epitélio oral de 32 usuários de crack, comparados a não usuários. A vasoconstrição local devido ao calor intenso pode resultar em efeito cáustico da droga no tecido gengival e necrose tecidual (COLODEL *et al.*, 2009). Albini (2013) relatou em seu estudo condição periodontal ruim em usuários de crack, quando comparados a indivíduos não usuários, pois 71% dos usuários de crack apresentavam higiene bucal precária e periodontite leve. Xerostomia, redução do fluxo salivar, redução do pH bucal foram

características largamente citadas em outros estudos transversais (PARRY et al. 1996; COLODEL *et al.*, 2009; WOYCEICHOSKI, 2008, 2013).

2.5 MACONHA

A maconha é o nome dado às folhas e flores secas da planta *Cannabis sativa*. Existem mais de 85 substâncias químicas distintas na planta denominadas fitocanabinóides (OLIÉRE et al., 2013), e entre eles, o delta-9- tetrahydrocannabinol (THC), principal componente da cannabis responsável pelos efeitos psicomiméticos produzidos pela droga (RIBEIRO *et al.*, 2006; FUCHS *et al.*, 2006).

Maconha é um dos agentes ilícitos mais utilizados no Brasil (CARLINI *et al.*, 2005). O composto é altamente lipofílico, capaz de atravessar as células sanguíneas, produzindo mudanças na membrana celular, principalmente nos órgãos onde os níveis de gordura são maiores como cérebro, testículos e tecido adiposo (JONES *et al.*, 1980). As taxas de absorção pulmonar são mais elevadas (90% a 95%) e lentas (30 a 45 minutos) em relação à absorção oral (4% a 20%). Os efeitos farmacológicos pela absorção pulmonar podem demorar entre 5 a 10 minutos para iniciarem (KALANT, 2001) e os sinais e sintomas de intoxicação por até 12 a 24 horas devido à liberação lenta dos canabinóides, receptores cerebrais, a partir do tecido adiposo (ADAMS, 1996). Segundo Jones *et al.* (1980) a concentração mínima para alterações psíquicas como intensa euforia é de 1% ou um cigarro de 2 a 5 mg. A droga atinge seu efeito entre zero e dez minutos após ser tragada e seu pico de ação ocorre após trinta minutos. Seus efeitos são atenuados após 45 a 60 minutos (RANGEL, 2004).

De acordo com a pesquisa Health Behavior in School aged Children (HBSC, 2011), da OMS, 17% dos adolescentes com 15 anos dos países da Europa e da América do Norte relataram uso de maconha pelo menos uma vez em suas vidas e 8%, usaram uma vez nos últimos 30 dias anteriores à pesquisa. Os meninos são mais propensos a usar maconha e sofrem influências sociais de amigos ou irmãos mais velhos. Nos Estados Unidos, 30% dos meninos e 26% das meninas fumaram maconha pelo menos uma vez na vida, assim como 16,0% dos meninos e 12,0% das meninas fumaram maconha nos 30 dias anteriores à pesquisa (CURRIE *et al.*, 2012).

O THC atua principalmente sobre o SNC produzindo efeitos psicotomiméticos, alucinógenos e depressores. Os receptores canabinóides, CB1 e CB2, são acoplados à ativação dos canais de potássio e inibição dos canais de cálcio, exercendo efeito inibitório sobre a liberação de transmissores nas sinapses nervosas. Ocorrem vários efeitos autônomos periféricos mediados centralmente; o mecanismo reflexo salivar atribuído ao THC é a atividade anticolinérgica e diminuição do volume salivar (RANGEL, 2004; OBID, 2011). CB1 são receptores canabinóides de ação central, acoplados à proteína G, presentes em regiões neuronais dopaminérgicas e outras regiões neurais como hipocampo, córtex cerebral, amígdala basolateral relacionadas com a memória, coordenação de movimentos e modulação de dor (OLIÉRE *et al*, 2013). Os receptores CB₁ estão presentes em inervações periféricas e tecidos não neuronais. A ativação desses receptores inibe a liberação de neurotransmissores inibitórios e excitatórios. (DALL'AGLIO *et al.*, 2010, OLIÉRE *et al.*, 2013).

Os receptores CB2 estão localizados nas células de defesa imunológicas. A simulação desses receptores nas células microgliais mostraram um papel modulador da resposta neuro-inflamatória na regulação de citocinas liberadas no cérebro (OLIÉRE *et al.*, 2013).

Os principais efeitos subjetivos em um indivíduo consistem em sensação de relaxamento e bem-estar, semelhante ao efeito do álcool mas sem agressão concomitante; sensação de consciência sensorial aguçada, com sons e visões que parecem mais intensas e fantásticas. Estes efeitos são semelhantes aos produzidos pelo LSD (Dietilamida do Ácido Lisérgico), geralmente menos pronunciados. As sensações alarmantes e as alucinações paranóicas que frequentemente ocorrem com o LSD são raramente experimentadas com a maconha (KOOB, 1992). Os efeitos neurológicos centrais predominantes são o comprometimento da memória e da coordenação motora, como exemplo, desempenho de dirigir e hiperfagia. Os efeitos periféricos são taquicardia, vasodilatação (marcante nos vasos da esclera e da conjuntiva ocular), indução da pressão intra-ocular e broncodilatação (FUNCHS *et al.*, 2006). Em doses elevadas, a maconha induz no usuário comportamento de ansiedade, confusão, paranóia, agressividade e psicose tóxica (OBID, 2011; SOUZA, 2007). Usuários de maconha, geralmente apresentam doença periodontal leve a severa, risco potencial à cáries devido à ingestão elevada de carboidratos, xerostomia e candidíase oral pela imunossupressão nos tecidos gengivais (CHO,

2005). Darling *et al.* (1993) observaram a ocorrência de estomatite nicotínica em usuários de maconha que nunca experimentaram cigarro de tabaco. Rawal *et al.*, (2014) relataram em estudo de relato de casos, as mesmas lesões apontadas por Darling *et al.* (1993). Os mesmos autores afirmam que a maconha apresenta efeito anticonvulsivante comparado à ação farmacológica da fenitoína e sustentam a hipótese para a ocorrência da similar hiperplasia gengival encontrada nesses indivíduos examinados. Eles acreditam na ocorrência dos mesmos mecanismos patogênicos que implicam essa condição.

2.6 SALIVA E COMPOSIÇÃO

As glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) são as principais responsáveis pela produção de saliva (95%). Outras glândulas salivares distribuídas pela mucosa bucal (exceto na gengiva e palato duro), lábios e ao longo da mucosa do trato aerodigestivo superior são responsáveis pelos 5% restantes da saliva secretada (FERRY, MYERS, 2008; MELVIN *et al.*, 2005). A saliva é uma mistura complexa derivada dos produtos aquosos secretados pelas glândulas salivares maiores e menores, componentes orgânicos como proteínas, enzimas e, inorgânicos (sais minerais e íons), restos alimentares, produtos do metabolismo bacteriano, microorganismos, células epiteliais descamadas, muco da cavidade nasal, exsudato dos sulcos gengivais, traços de medicamentos e produtos químicos (HUMPHREY, WILLIAMS, 2001; ERICSON, MAKINEN, 1998; SCULLY, EPSTEIN, 1992; DOUGLAS, 1998).

O maior constituinte da saliva é a água. As concentrações iônicas não são constantes devido às variações do ciclo circadiano, natureza e duração do estímulo mastigatório e olfatório, mudanças hormonais, drogas simpatomiméticas e parasimpaticomiméticas e composição do plasma (APS, MARTENS, 2005). Mudanças no fluxo salivar sofrem interferências por diferenças individuais e pelos fatores citados (APS, MARTENS, 2005).

Os componentes orgânicos (proteínas e glicoproteínas) são sintetizadas pelas células secretórias. O número de ácinos e proteínas biosintetizadas podem diminuir com a idade (APS, MARTENS, 2005).

Os principais fatores que podem interferir na composição salivar são: ciclo circadiano, hábitos de dieta, uso de medicamentos, condição de saúde dental e

periodontal, uso e/ou abuso de drogas ilícitas (APS, MARTENS, 2005; D'AMORE et al., 2011). A deficiente higiene bucal em dependentes químicos contribui para o surgimento de lesões cariosas, erosivas ou perdas dentárias, inflamação gengival e doença periodontal (CHO *et al.*, 2005; D'AMORE et al., 2011). A partir do fluído crevicular gengival, haverá maior secreção e atividade de proteínas de defesa (citocinas e imunoglobulinas) devido à presença acumulada de placa bacteriana (SANCHEZ *et al.*, 2011).

2.6.1 Funções da Saliva

O fluído salivar possui inúmeras funções relacionadas com a hemostasia da cavidade bucal e saúde sistêmica (NAVAZESH *et al.*, 2002). Além da atividade enzimática, a saliva contribui para o processo digestivo, lubrificando o bolo alimentar e desta forma, facilitando a mastigação e deglutição. Inúmeras substâncias nocivas ao organismo e alguns medicamentos são excretados pela saliva, que assim funciona como um veículo de desintoxicação (CARPENTER, 2013).

A saliva desempenha função de proteção do meio bucal, mediante a ação de substâncias antibacterianas, como também participa na manutenção do equilíbrio hídrico, regulando a excreção de líquido do organismo (PINHEIRO, 2000).

Mickenausch *et al.*, (2005) realizaram uma revisão sistemática sobre o assunto e concluíram que o fluxo salivar estimulado inferior aos limites normais, <1,0ml/min de saliva estimulada pode ser considerado fator determinante para desenvolvimento de lesões cariosas.

As propriedades da saliva são modificadas pelas glicoproteínas e íons que permitem a execução das múltiplas funções que a saliva exerce. A manutenção do fluxo salivar abundante é fundamental na remoção de bactérias, equilíbrio do pH e saúde bucal (DEWHIRST *et al.*, 2010).

A saliva é supersaturada de cálcio em relação à hidroxiapatita, principal componente do dente (PROCTOR *et al.*, 2005). A maior concentração de cálcio salivar é influenciada e ligada à proteína estaterina e o fosfato, ligado às PRPs (proteínas ricas em prolina). A estaterina é a maior proteína componente da película do esmalte (LUR *et al.*, 2004) com propriedade lubrificante, principal proteína enzimática envolvida no processamento do bolo alimentar (DOUGLAS, 1999;

HARVEY *et al.*, 2011). O principal efeito benéfico é a prevenção da precipitação excessiva de cálcio dos dentes, especialmente nos nichos de placa bacteriana, em margem gengival de esmalte, surgindo o cálculo dental (HAY *et al.*, 1996; CARPENTER, 2013).

2.6.2 Fisiologia da secreção salivar

O volume de saliva secretada diariamente varia em média entre 500 a 800 mL (CARPENTER, 2013, PUY, 2006). As variações desse volume e composição da saliva dependem de fatores controladores da secreção salivar, que é contínua e exclusivamente regulada por mecanismos reflexos condicionados e incondicionados. Os fundamentais controladores são o Sistema Autônomo e o Sistema Endócrino (DOUGLAS, 1999). O maior volume salivar é produzido antes, durante e após as refeições, alcançando um pico máximo às 12 horas, diminuindo à noite (PUY, 2006).

O controle neuro-autônomo secretório salivar é regulado simultaneamente pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS) e Sistema Nervoso Parassimpático (SNPS), estímulos diretos ou reflexos. Ambos trabalham harmoniosamente e quando estimulados, podem agir sinergicamente (AIRES, 2008). Os estímulos nervosos das glândulas salivares inervadas pelo SNPS geram a produção de saliva abundante e aquosa provocada pela vasodilatação glandular, com baixo teor de proteína salivar e o SNS resulta em fluxo muciginoso de saliva, pouco aquosa devido à vasoconstrição acentuada e alta concentração de proteína (DOUGLAS, 1999; APS, MARTENS, 2006; PROCTOR, CARPENTER, 2007; CARPENTER, 2013).

O SNS estimula a contratilidade das células mioepiteliais, induzindo a saída da saliva primária (pré-formada), aumentando transitoriamente o fluxo salivar atingindo os ductos excretórios das glândulas. Porém logo após o estímulo, o fluxo salivar diminui de forma gradativa e definitiva, efeito que dura até cessar o estímulo simpático (GUYTON; HALL, 2006). Ocorre nesta segunda ação, a redução do fluxo sanguíneo da glândula salivar, produzido pela vasoconstrição simpática adrenérgica (DOUGLAS, 1999). Na hiperatividade simpática pode ocorrer xerostomia (APS, MARTENS, 2005).

O SNPS é fundamental na regulação da função salivar. Os nervos corda do tímpano e glossofaríngeo são partes do SNPS eferente e sua excitação determina o estímulo da glândula salivar, aumentando a velocidade de formação de saliva, o

consumo de oxigênio e irrigação sanguínea da glândula. O efeito parassimpático é duplo, por um lado estimula diretamente as células salivares (acinares e ductais), relacionadas com as fibras parassimpáticas e por outro lado, o pólo basal das células, estimulado pela concentração de acetilcolina nas células salivares e mudanças de potencial elétrico provocado pelo estímulo do SNPS. A ação indireta aumenta o fluxo sanguíneo, potencializando o fornecimento de oxigênio, água, eletrólitos e substratos para a função glandular (AIRES, 2008; BRADLEY, 1988).

A secreção da saliva ocorre em resposta simultânea à estímulos parassimpáticos e simpáticos do sistema nervoso central. No estímulo simpático, ocorre ativação de receptores α adrenérgicos, que gera abundante fluxo de íons cálcio pelas células secretórias resultando em alta secreção de proteínas. Nessa condição, há baixa concentração de mucina, resultando num baixo volume salivar. A ativação de receptores β adrenérgicos não resulta em alto fluxo de eletrólitos, mas alta concentração de proteínas provenientes dos ácinos. Este estímulo resulta em secreção viscosa rica em mucina e proteína. Esse tipo de secreção salivar apresenta aspecto espumoso, enquanto o volume salivar produzido é mais baixo (APS, MARTENS, 2005).

O sistema nervoso parassimpático inicia a secreção salivar e é capaz de sustentar altas taxas de secreção em resposta aos reflexos condicionados, como olfato e paladar e reflexos de pressão transmitidos para a cavidade oral. O estímulo parassimpático é mediado pela acetilcolina, que atua em receptores muscarínicos (M1 e M3) e esses, se localizam nas membranas das células acinares (GAUTAM *et al.*, 2004), as quais promovem a produção de abundante volume salivar devido à ativação de proteínas G, presentes nas paredes membranosas dessas células. Essas proteínas são intermediadoras para a resposta celular, onde ocorre um aumento dos níveis de cálcio intracelular devido à interação com receptores IP₃ (trifosfato de inositol) intra celular e abertura dos canais de cálcio ativados pelos canais de cloro e potássio (BAUM, 1993; TURNER, SUGIYA, 2002).

A velocidade que a saliva flui através dos ductos determina a concentração dos eletrólitos. Em alta velocidade, menor é o tempo para trocas iônicas. A alta concentração de bicarbonato em condição de repouso resulta em alta capacidade tampão salivar em salivacção estimulada. Inicialmente, as concentrações de proteína total e mucina por milímetro diminuem drasticamente, enquanto a taxa de salivacção é rápida, eventualmente alcança volume constante das concentrações de proteína

total e mucinas secretada por minuto. Níveis de eletrólitos e proteínas aumentam proporcionalmente à taxa de secreção (AMEROGEN, 2004).

Uma fina camada de células epiteliais separa os ductos salivares do sistema circulatório. A membrana lipídica dessas células é que determina a transferência de moléculas do plasma para a saliva. A passagem através dessas membranas é limitada para moléculas de peso molecular acima de 500 daltons e sua entrada é influenciada pela ligação às proteínas plasmáticas (HUESTIS; CONE, 1998).

Em condições normais, as células acinares são dotadas de receptores da superfície celular e de hormônios intracelulares como receptores adrenérgicos, muscarínicos-colinérgicos, neuropeptidérgicos, insulínicos, tireoideanos e de esteróides. Esses receptores são importantes no processo secretório das glândulas salivares. A secreção salivar ocorre em consequência de sinais nervosos parassimpáticos provenientes dos núcleos salivares superiores e inferiores no tronco cerebral. A estimulação simpática, com origem nos gânglios cervicais superiores, pode aumentar a salivação porém, em menor grau à estimulação parassimpática (GUYTON; HALL, 2006). Cada glândula salivar é composta de um sistema bem vascularizado de ácinos e ductos e, através do suprimento sanguíneo das glândulas salivares, é liberado um hormônio chamado polipeptídio intestinal vasoativo, oriundo das terminações do nervo parassimpático, juntamente com a Acetilcolina (BERNE; LEVY, 1990). Esta substância contribui para a vasodilatação das glândulas salivares, ocorrendo uma nutrição adequada e função normal (BAUM, 1993). Os usuários de drogas ilícitas apresentam alterações do sistema nervoso e circulatório, e essas anormalidades nesses sistemas podem gerar fator de risco cumulativo para distúrbios na secreção salivar. As substâncias psicoativas aparecem no fluído salivar por simples difusão passiva devido ao baixo gradiente de concentração das moléculas das drogas sem gasto energético (APS; MARTENS, 2005). Alterações na secreção e composição salivar podem ocorrer devido ao consumo abusivo de drogas ilícitas (CHO *et al.*, 2005).

ENBERG *et al.* (2001) observaram a velocidade do fluxo salivar, atividade da amilase, proteínas e concentração de eletrólitos na saliva de consumidores agudos de álcool em comparação a um grupo controle. A velocidade do fluxo salivar estimulado diminuiu significativamente depois do consumo de álcool. A atividade da amilase, proteínas totais, concentração de sódio e cálcio diminuíram significativamente nos primeiros 45 minutos, após a primeira ingestão. Após 110

minutos da primeira ingestão, a produção de todos os eletrólitos estudados diminuiu significativamente e a concentração de álcool no plasma sanguíneo apresentou-se aumentada. Proctor *et al.* (2007) encontraram diferentes respostas na síntese de proteínas nas glândulas parótida, submandibular e sublingual de ratos após a ingestão contínua de álcool. Os autores concluíram que o álcool pode afetar alguns aspectos da função das células secretórias, contribuindo para mudanças na composição salivar.

Sanchez (2011) destaca em um estudo transversal, a resposta das glândulas salivares e do fluido crevicular via estímulo nervoso simpático diante do processo inflamatório periodontal. A hipótese para o aumento da secreção de proteínas salivares (mucina, amilase, cistatinas e imunoglobulina A) consiste no potencial de proteção da saliva na presença de inflamação (gengivite e doença periodontal). Haskó (2001) afirma que existe influência da regulação simpática sob a secreção salivar e resposta imunológica local e sistêmica.

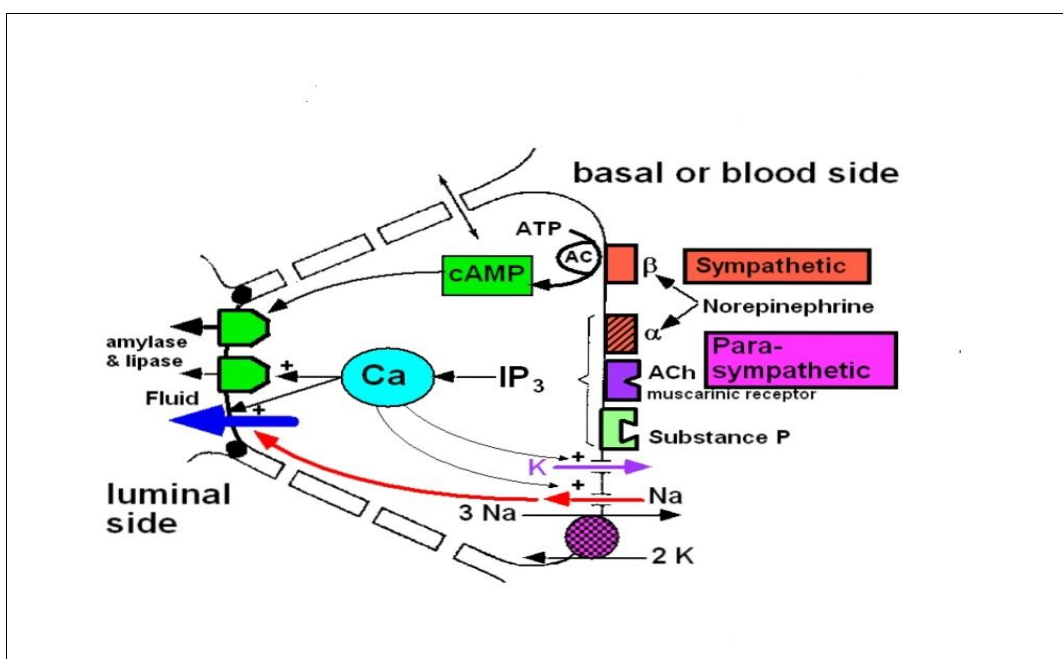


FIGURA 1. CÉLULA ACINAR. Efeitos parassimpático e simpático sobre a secreção da célula acinar. α e β - receptores noradrenérgicos α e β , respectivamente; **cAMP**-monofosfato cíclico de adenosina; **ACh**- acetilcolina; **IP₃**- trifosfato de inositol; **ATP**-trifosfato de adenosina; **AC**- adenilciclase; substância **P**- receptor peptidérgico; **Ca**-cálcio; **Na**- sódio; **K**- potássio. FONTE: AIRES, 2008.

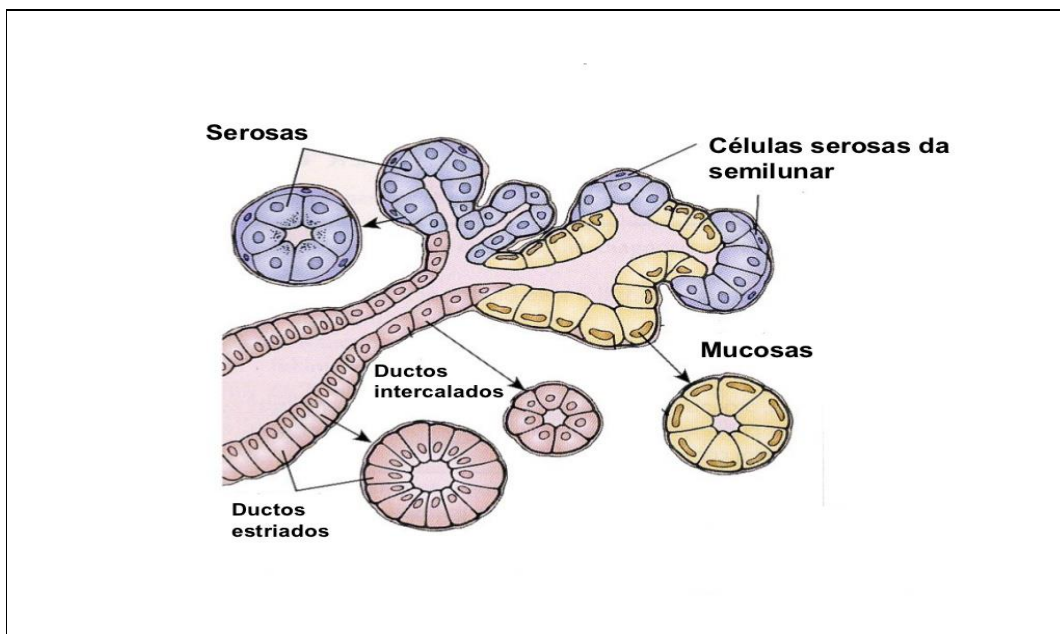


FIGURA 2. ADENÔMERO DE GLÂNDULA SALIVAR.Unidade morfofuncional de célula acinar e ductal de glândula submandibular.Células serosas e mucosas revestem as células acinares no lumen celular onde a saliva primária é isotônica em relação ao plasma.; ductos intercalares e estriados conduzem a saliva produzida nos ácinos, se torna hipotônica em relação ao plasma e é lançada na cavidade bucal. FONTE: AIRES, 2008..

2.6.3 Saliva como método diagnóstico

A saliva representa um importante meio diagnóstico no monitoramento da saúde bucal e análise de distúrbios de seus componentes (LAWRENCE, 2002; CASTAGNOLA, 2011). As vantagens de se utilizar o fluído salivar para o diagnóstico em substituição ao sangue consistem ao acesso fácil, indolor e método de coleta não invasivo (HU *et al*, 2008). A possibilidade desta substituição justifica-se pela inter-relação existente entre soro sanguíneo e as concentrações dos componentes salivares (DOUGLAS,1999).

A determinação de certas drogas no fluído salivar depende da concentração no sangue e sua capacidade de difusão, lipossolubilidade e peso molecular. Há alta correlação entre as concentrações de etanol na saliva e no plasma. A presença de tiocianeto na saliva indica atividade de fumo passivo. Drogas ilícitas como cocaína, crack e maconha podem ser detectadas na saliva (NAVADESH *et al*., 2002). A passagem das drogas através das membranas epiteliais é explicada pela alta lipossolubilidade molecular resultando em difusão passiva, caracterizada pela

transferência de moléculas da droga abaixo do gradiente de concentração sem gasto energético. A taxa de difusão da droga está em função do gradiente de concentração, à área de superfície em que ocorre a transferência e a espessura da membrana (IDKAIDEK, 2012). As variáveis que influenciam o tipo de transporte são pH, pKa, solubilidade lipídica, carga, peso molecular e configuração espacial, dose e *clearance* da droga, nível de proteína plasmática, fluxo salivar, proteínas e enzimas salivares capazes de metabolizar a droga (KIDWELL *et al.*, 1998; HOFMAN, 2001)

A saliva tem sido utilizada como meio diagnóstico por mais de 2000 anos. Os médicos da tradicional medicina chinesa consideravam a saliva e o sangue como “irmãos”, pois acreditam que provinham da mesma origem (LOO; WONG, 2010). Mudanças no odor ou na espessura da saliva e alterações de sua percepção gustativa são indicativos de sintomas de determinadas doenças. A saliva humana ajuda a controlar a saúde oral, estabelecendo a comunicação química entre as pessoas, como acontece com outros mamíferos (SOINI *et al.*, 2010). Os avanços tecnológicos tem propiciado o uso da saliva como um fluido diagnóstico. O exame salivar possibilita detectar microorganismos bucais, substâncias químicas presentes no organismo dos indivíduos e marcadores imunológicos. Existe um modelo hierárquico para avaliar a efetividade dos métodos diagnósticos que consistem em cinco níveis básicos (STREKFUS, BIGLER, 2002):

- 1) Analítico (precisão e acurácia)
 - 2) Diagnóstico (sensibilidade e especificidade)
 - 3) Resultado eficaz (decisão médica)
 - 4) Operacional (valor de preditivo e eficiência)
 - 5) Análise do custo benefício com relação a precisão de resultado no manejo com o paciente
 - 6) Avaliação do custo/benefício dos resultados fornecidos pelos exames.
- Estes parâmetros têm como objetivo reduzir a morbidez e mortalidade da população doente ou sintomática.

As proteínas salivares desempenham o papel de manutenção da saúde bucal e de marcadores biológicos de doenças, consequentemente o proteoma salivar humano é relevante para a pesquisa na especialidade diagnóstica na biologia oral (HU *et al.*, 2008). Além disso, através da saliva podem ser avaliados alguns parâmetros que podem estar modificados em dependentes químicos.

2.7 CÁLCIO

Aproximadamente, 99% de cálcio do organismo está localizado no esqueleto. O cálcio desempenha numerosas e significativas funções como a participação na transmissão do impulso nervoso, no mecanismo da coagulação, na modulação da ação de vários hormônios, nas atividades de sistemas enzimáticos e na contração muscular (MOLINA, 2007). O cálcio salivar atua na remineralização do esmalte e ativa determinadas enzimas, contribuindo para a homeostasia bucal e defesa às cáries. Ele é encontrado sob a forma de um íon bivalente na saliva humana na concentração média de 5 a 7 mg/100mL (CRAIG, STITZEL, 1996). A secreção do cálcio acontece associado com as proteínas do zimogênio dentro do lúmen do ácino e sua concentração depende do fluxo salivar, de acordo com o pH salivar (DOUGLAS, 1999). À medida que o fluxo salivar aumenta, as concentrações de cálcio e proteínas totais se elevam, segundo Douglas (1999).

2.7.1 Cálcio na fisiologia humana

Há duas formas de apresentação do cálcio: cálcio ionizado e cálcio ligado. O ionizado participa do equilíbrio dos fosfatos de cálcio do tecido dentário mineral duro e seu líquido adjacente. A forma ligada se relaciona com macromoléculas, dentre essas a histidina, estaterina e proteínas ricas em prolina. O cálcio é o principal cofator da enzima amilase (TENOVUO; LANGERHOF, 1995).

Estudos de Melvin *et al.* (2005) demonstram que o cálcio é responsável pela ativação dos mecanismos que envolvem a secreção salivar e esse processo é dependente do influxo de cálcio extracelular. Putney *et al.* (2001) demonstraram em suas pesquisas que a maior concentração de cálcio a partir dos ácinos acontecia quando as células eram estimuladas por agonistas que desencadeavam a secreção salivar. A hipótese sugerida para o fato foi explicada pelo estímulo dado à célula provoca mudanças na homeostasia intracelular e da permeabilidade da membrana plasmática. As pesquisas mostraram o Cálcio atua como sinalizador da regulação celular, controlando a polarização na secreção das glândulas salivares (CHENG; HONG, 2011; AMBUDKAR, 2012) .

A determinação das concentrações de cálcio é importante para o diagnóstico de distúrbios relacionados como a hipercalcemia e hipocalcemia. Hipercalcemia é

causada por hiperparatireoidismo, imobilizações de caráter agudo, doenças neoplásicas, intoxicações por vitamina D, sarcoidose, síndrome leite-álcalis, hipertireoidismo e insuficiência supra-renal aguda, tirotoxicose, acromegalia, diuréticos tiazídicos e fase diurética de necrose tubular aguda. A hipocalcemia deve ser examinada em relação a concentração de proteínas plasmáticas e pH sanguíneo antes de avaliar sua importância. O cálcio total está reduzido nos casos de hipoalbuminemia e acidoses crônicas, devido a uma diminuição do cálcio ligado a proteínas. Nestes casos a fração ionizada do cálcio permanece normal. As causas comuns de hipocalcemia verdadeira incluem a hipoavitaminose D, hipoparatireoidismo, pseudo-hipoparatireóidismo, hiperfosfatemia, desordens neoplásicas, tetania neonatal, pancreatite aguda, deficiência de magnésio, acidose tubular renal excesso de corticoesteróides e terapia prolongada com anticonvulsivantes (MOLINA, 2007).

2.8 FÓSFORO

Fósforo é um elemento não metálico, classificado como macromineral presente no corpo humano em quantidades aproximadas de 800 mg em um adulto, 500 a 600g de fósforo medido como fosfato inorgânico. Cerca de 85% do fósforo no corpo humano encontra-se nos ossos e dentes, principalmente na forma de hidroxiapatita, a uma razão de 1:2 em massa, com o cálcio. O fósforo constitui aproximadamente 1% do peso corpóreo do ser humano (OLIVEIRA, 2007). O fósforo restante encontra-se nos músculos, fígado, intestino, tecido nervoso, principalmente na forma de ésteres orgânicos (íons fosfato) e nos fluídos biológicos (LEMANN, 1996).

É encontrado na natureza geralmente na forma de orto-fosfatos. Ocorre também como apatitas, rochas fosfáticas, e fosforitas marinhas. Sua estrutura eletrônica permite que forme complexos com compostos orgânicos e que se combine com outros elementos na forma de ácidos, sais e óxidos (TOMASSI; KREIDER, 2002).

2.8.1 O Fósforo na Fisiologia Humana

O fósforo participa na formação e mineralização da matriz óssea, no alívio de dores provocadas pela artrite, no estímulo das contrações musculares incluídas nos músculos cardíacos, na assimilação das vitaminas B₂ e B₃ e transmissão dos impulsos nervosos (OLIVEIRA, 2007). O fósforo, na forma de íons fosfato ou de diferentes compostos orgânicos intra e extracelulares ou a nível de membrana celular, atua também em muitas outras funções fisiológicas (MCDOWELL, 1992) como por exemplo:

- a) regulação da atividade protêica;
- b) absorção e transporte de nutrientes;
- c) metabolismo energético;
- d) ativação de reações em todas as áreas do metabolismo;
- e) tampão intracelular e extracelular;
- f) estrutura e funcionamento da membrana celular.

O fósforo na forma de íons fosfato são essenciais para o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, funcionando como co-fator em vários sistemas enzimáticos. Além disso, ele participa da composição de substâncias com alto potencial metabólico como, o ATP (trifosfato de adenosina), principalmente, o GTP (trifosfato de guanina), o ITP (trifosfato de inositol) e outros nucleotídeos. Os fosfatos também desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-base no plasma e entre as células devido à capacidade tampão (LEMANN, 1992).

O fósforo encontrado no plasma está em equilíbrio não só com os fosfatos inorgânicos dos ossos e das células, mas também com um grande número de compostos orgânicos resultantes do metabolismo celular (TOMASSI; KREIDER, 2002).

O fosfato inorgânico da saliva tem muitas funções biológicas, sendo a mais importante a contribuição para o produto de solubilidade com relação ao fosfato de cálcio visando a manutenção da estrutura dentária. É um importante elemento na capacidade tampão salivar e participa como nutriente para microbiota oral, essencial na glicólise (metabolismo). É um ânion importante tanto intra como extracelular. No líquido extracelular e em pH fisiológico, a maior parte do fosfato existe nas formas inorgânicas monovalentes (diidrogenofosfato) e divalentes (hidrogenofosfato), e é estreitamente regulado com o cálcio (APS; MARTENS, 2005). Nas células,

predomina o fosfato orgânico, onde é encontrado como componente dos ácidos nucleicos, fosfolipídios e fosfoproteínas, além de participar do metabolismo intermediário. Extracelularmente, o fosfato está intimamente associado ao cálcio. Juntos formam cristais de hidroxapatita presentes nos ossos. Ocasionalmente, cristais de fosfato de cálcio precipitam em outras áreas do corpo. Níveis de fosfato de cálcio anormalmente elevados muitas vezes provocam a formação de cálculos nos rins ou bexiga (GARCIA; KANAAN, 2008). A determinação do fosfato é importante para o diagnóstico de hiperfosfatemia e hipofosfatemia. A primeira é encontrada no hipoparatiroidismo, hipervitaminose D, fraturas ósseas em consolidação, obstrução pilórica, doença de Addison, tratamento citotóxico de certas leucemias e linfomas, tumores ósseos metastáticos e cetoacidose diabética. Já a hipofosfatemia está presente nas deficiências de vitamina D, como por exemplo, raquitismo, osteomalácia e esteatorreia, hiperparatiroidismo, síndrome de Fanconi, hiperinsulinismo, uso crônico de antiácidos, alcoolismo crônico, síndromes de má-absorção e, ocasionalmente, hiperalimentação (FUCHS, 2006).

2.9 PROTEÍNAS

Proteínas são moléculas orgânicas formadas a partir da ligação peptídica entre dois aminoácidos e sua estrutura constituída por combinações entre apenas vinte aminoácidos em diversas proporções e cumprem funções estruturais, reguladoras, de defesa e de transporte nos fluídos biológicos (ROSSI, 2009). A importância das proteínas estendem-se principalmente à catálise enzimática (digestão alimentar), transmissão de impulsos nervosos, controle no crescimento e da diferenciação celular, entre outras funções (BAYNES, DOMINICZAK, 2000).

As proteínas totais sistêmicas constituem 7% do volume plasmático sendo sintetizadas no fígado em sua maioria. A concentração de proteínas totais circulantes no organismo é diretamente proporcional ao cálcio plasmático. A diminuição da concentração do cálcio também influenciará níveis mais baixos de proteínas totais circulantes, também ocorrendo a situação contrária. (GENOVESE, 1995).

As proteínas salivares são formadas nas células acinares das glândulas salivares e a concentração tem relação dependente com o fluxo salivar. As proteínas

são os elementos mais abundantes e importantes da saliva e são classificadas preponderantemente de acordo com suas características químicas e atividades biológicas (PINHEIRO, 2000).

As glândulas salivares maiores secretam a maior parte das proteínas. A Parótida contribui com 20-30% da secreção de proteínas totais na saliva e com 80% da síntese das enzimas (CASTAGNOLA, 2010).

Pesquisas realizadas por Ikawa *et al.* (1991) e Matsuo *et al.* (2000) mostram que a quantidade de proteínas salivares secretadas diminuiu na presença de bloqueadores β adrenérgicos comparada às glândulas sem tal bloqueio ou denervação simpática. O estímulo simpático causa depleção do estoque de grânulos protêicos das células acinares em grande parte das glândulas salivares estudadas (PROCTOR *et al.*, 2003). As proteínas salivares medeiam o transporte iônico dos eletrólitos da saliva e o gradiente iônico criado permite movimentação do fluido salivar ao mesmo tempo que a saliva é formada (MELVIN *et al.*, 2005).

A secreção das proteínas salivares pode ser significativamente diferente entre as glândulas maiores (parótida e submandibular e sublingual). Siqueira *et al.* (2008) identificaram 56 proteínas, 12 das quais nunca haviam sido identificadas. A única característica das glândulas menores relacionada com a secreção é a qualidade da saliva e o número dos componentes presentes. As glândulas menores secretam imunoglobulinas, PRPs, cistatinas, mucinas, histatinas e amilase. Proteínas novas somavam 20% de todas as proteínas identificadas (CASTAGNOLA, 2010).

Proteínas como histatina e sialina controlam o pH salivar e atividade metabólica bacteriana (NAUNTOFTE *et al.*, 2003). Proteínas ricas em prolina (PRPs), estaterina, histidina e cistatinas têm capacidade de ligação à hidroxiapatita, inibindo a precipitação espontânea de cálcio e fosfato, mantendo a integridade dos cristais do esmalte (CARPENTER, 2013). As proteínas mais importantes envolvidas com a homeostasia do ecossistema bucal são: PRPs, lisozima, lactoferrina, peroxidases, aglutininas, histidinas e imunoglobulinas A e G e M (LIÉBANA, GONZÁLES, PARRA, 2002).

2.10 URÉIA

A uréia salivar é excretada principalmente pelo túbulo intralobular estriado das glândulas salivares (DOUGLAS, 1999), sendo um indicador da síntese protéica nas células acinares (MANDEL, 1980). A maior parte da uréia é formada no fígado e na presença de hepatopatia grave, o nível sanguíneo da uréia diminui e o da amônia aumenta (GANONG, 1998), portanto a concentração da amônia salivar estará aumentada. A uréia também reflete os danos sofridos pelas células das glândulas salivares (COWMAN, 1983; BECCIOLONI, 1984).

A uréia é clivada pelas bactérias bucais em amônia e dióxido de carbono, resultando em aumento de pH salivar. SUDDICK, HYDE, FELLER (1984), afirmam que a uréia exerce função importante na fisiologia salivar devido a capacidade de neutralização dos ácidos produzidos pelo metabolismo das bactérias do biofilme.

A uréia é um componente orgânico normal da saliva, que causa uma rápida elevação no pH do biofilme dental e representa o produto final do catabolismo humano das proteínas. É um indicador da síntese protéica nas células acinares (MANDEL, 1980). Estudos demonstram que concentrações elevadas de uréia salivar podem ser indício de doenças sistêmicas (PAJUKOSKI *et al*, 1997). A uréia é clivada pelas bactérias bucais em amônia e dióxido de carbono, resultando em aumento do pH bucal, porém a amônia é potencialmente citotóxica para os tecidos gengivais (SLOTS *et al*, 1984). Esta substância pode aumentar a permeabilidade do epitélio sulcular a outras substâncias antigênicas e tóxicas, promover a formação de cálculo dental e desempenhar um papel no processo de iniciação da gengivite (SINGER *et al*, 1978).

A saliva de indivíduos imunes à cárie pode apresentar um teor de amônia mais elevado em comparação àqueles que apresentam cárie (SHAFFER, HINE, LEVY, 1987). Este fato sugere que a elevada concentração de amônia retarda a formação de biofilme, neutralizando o pH bucal.

A concentração de uréia na saliva total de indivíduos saudáveis varia de 2 a 4mmol/L; no entanto, ela é mais concentrada na saliva das glândulas acessórias quando pode atingir uma média de 5mmol/V (MACPHERSON, DAWES, 1991).

2.11 INTERRELAÇÃO DO ABUSO DE DROGAS E PARÂMETROS SALIVARES EM DEPENDENTES QUÍMICOS:

Até o presente, não existem dados que demonstrem alterações na concentração de proteínas totais, uréia, cálcio e fósforo na saliva total estimulada de dependentes químicos. Os números alarmantes e crescentes de usuários de drogas ilícitas no mundo tomou-se um problema de saúde pública, portanto, é relevante a avaliação sialoquímica nessa população. Diante do conhecimento dos parâmetros normais das variáveis acima citadas, este estudo visa detectar alterações nesses parâmetros em dependentes químicos.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi investigar as alterações de alguns parâmetros salivares em dependentes químicos em tratamento para desintoxicação

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar as concentrações salivares de proteínas totais, uréia, cálcio e fósforo dos dependentes químicos.
- b) Comparar as concentrações salivares de proteínas totais, uréia, cálcio e fósforo dos dependentes químicos com um grupo de indivíduos não dependentes químicos.
- c) Avaliar o fluxo salivar total estimulado de ambos os grupos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná e está registrado sob o número do CAAE: 01100912.4.0000.0102 (Anexo 1). Esta pesquisa é continuação de outro projeto (adendo) para análise das variáveis descritas no objetivo do estudo.

4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este trabalho foi um estudo transversal.

4.3 LINHA DE PESQUISA:

O trabalho foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa de Diagnóstico e Tratamento de Alterações Bucais.

4.4 AMOSTRA / POPULAÇÃO

Para este estudo, foram utilizadas 54 amostras salivares de indivíduos do sexo masculino com idades semelhantes de acordo com os seguintes grupos:

a) Grupo dependente químico: 27 indivíduos usuários de maconha, cocaína, crack e bebidas alcoólicas. Esses pacientes se encontravam internados para tratamento de desintoxicação química no Instituto de Pesquisa e Tratamento do Alcoolismo – IPTA (Campo Largo-PR), hospital com especialidade psiquiátrica de média complexidade e seu modelo terapêutico é a internação de 45 dias.

b) Grupo não dependente químico: 27 indivíduos adultos do sexo masculino que nunca utilizaram drogas ilícitas (crack, cocaína e maconha) usuários ocasionais de álcool. Estes indivíduos foram pareados individualmente com o grupo de estudo em relação a idade e estavam trabalhando ou estudando na Academia Policial Militar do Guatupê (Curitiba – PR).

4.5 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE NO GRUPO DE ESTUDO

4.5.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo somente indivíduos que atendessem os seguintes critérios:

- a) Ser alcoólatra;
- b) Ser usuário crônico de drogas ilícitas;
- c) Ausência de doenças nas glândulas salivares, relatado na entrevista;
- d) Não ter lesão bucal com sangramento ativo ou potencial.
- e) Não ter feito tratamento dentário nas últimas 24 horas;
- f) Não ter trismo.

Esses indivíduos não haviam iniciado a medicação para desintoxicação.

4.5.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo indivíduos que atendessem aos seguintes critérios:

- a) Aqueles com baixo nível cognitivo percebido na entrevista;
- b) Quantidade de saliva insatisfatória para a análise;

Os indivíduos selecionados do grupo não dependente químico obedeceram os mesmos critérios de inclusão do grupo de estudo, com exceção do consumo de drogas. Foram excluídos aqueles que faziam uso de alguma medicação de uso contínuo.

4.6 COLETA DE DADOS

Os participantes que foram convidados e consentiram em relação aos objetivos da pesquisa, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Apêndice 1) da pesquisa de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR. Em seguida foi realizada anamnese (Apêndice 2), aplicada individualmente pelo pesquisador em uma sala reservada e na sequência, exame clínico bucal foi executado. O exame clínico realizado nos participantes foi em cadeira comum, sob iluminação artificial. Um abaixador de língua estéril e compressas de gaze foram utilizados para afastar os tecidos moles bucais. Qualquer lesão em tecido mole e/ou dentes cariados que fossem encontrados, o participante era informado e encaminhado à clínica de Semiologia da UFPR para posteriormente receber o tratamento mais adequado.

4.7 COLETA DA SALIVA

A saliva total foi coletada fora do ambiente odontológico seguindo o método de *spitting* por meio de estimulação mecânica usando um pedaço de látex estéril e um coletor do tipo universal (Figura 3). O tempo total da coleta foi de 6 minutos, sendo que a saliva produzida no primeiro minuto era deglutida pelos pacientes. Após este tempo, nos 5 minutos seguintes, toda a produção de saliva foi depositada no coletor do tipo universal de acordo com a metodologia preconizada por Navazesh (2002) (Figura 4). Cada participante forneceu uma amostra de saliva. O horário padronizado para a coleta salivar foi entre 09h00min às 11h00min horas da manhã, devido a menor variação e maior estabilidade da composição salivar de acordo com o ciclo circadiano (DAWES, 1987). Os participantes receberam orientações no dia anterior da coleta salivar para não consumir nenhum alimento ou bebida (com exceção de água) no período de 1 hora antes da coleta e permanecer em repouso 1 hora antes da coleta. No dia da coleta, foram orientados a lavar a boca com água por meio de bochechos.

As amostras de saliva foram encaminhadas ao laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (Curitiba- PR), devidamente acondicionadas no interior de um recipiente de isopor contendo gelo e imediatamente congeladas em

freezer (F17 Stooock Freezer, Prosdócimo, Curitiba-PR) até o início das análises. A avaliação da velocidade do fluxo de saliva total mecanicamente estimulada foi realizada pelo Método Gravimétrico preconizado por Banderas-Tarabay *et al.* (1997). Em seguida, procedeu-se à avaliação dos valores da velocidade do fluxo salivar estimulado, segundo o método de Krasse (1988):

- a) Alto: valor de fluxo ≥ 1 ml/min
- b) Médio: valor de fluxo = 0,7 - 0,9 ml/min
- c) Baixo: valor de fluxo $\leq 0,6$ ml/min



FIGURA 3: Material usado na coleta da saliva. Pedaco de látex estéril e recipiente coletor universal usados na coleta da saliva.

FONTE: Bellani, Willian (2013)



FIGURA 4. Coleta da saliva: indivíduo mastigando pedaço de látex, segurando o recipiente coletor universal.

FONTE: Bellani, Willian (2013)

4.8 AVALIAÇÃO SIALOQUÍMICA

A avaliação sialoquímica da saliva foi realizada para as quatro variáveis já citadas. Antes das análises, as amostras de saliva foram centrifugadas por meio de uma Centrífuga FANEM (São Paulo-SP) com rotação de 3000rpm por 10 minutos.

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976). As variáveis uréia, cálcio e fósforo foram analisadas por meio de um espectrofotômetro de absorvância (S-2000 UV - VIS, SP), com utilização de kit comercial da empresa *Labtest*® (Lagoa Santa, MG) específico para cada variável. As recomendações preconizadas pelo fabricante foram seguidas durante o preparo bioquímico das amostras. Os testes bioquímicos foram realizados em duplicata para cada amostra das variáveis analisadas.

4.8.1 Determinação de Proteínas Totais

O método eleito para análise de proteínas totais das amostras foi BRADFORD (1976). O Método de Bradford (1976) é utilizado na determinação do conteúdo de proteínas totais salivares que se ligam ao corante de um modo proporcional à concentração. O corante utilizado é o Comassie Brilliant Blue G- 250, o qual existe em duas formas coloridas diferentes, a vermelha e a azul. A forma vermelha é convertida na forma azul após a ligação do corante com a proteína. Esta coloração ocorre rapidamente (2 minutos) e é estável por até uma hora. O método tem sensibilidade para detectar até 5µg/mL de proteína salivar (NELSON *et al*, 2000). As amostras salivares foram descongeladas e as análises realizadas conforme os grupos ordenados. Esse método foi eleito devido à alta sensibilidade na determinação da concentração de proteínas na saliva.

Para o preparo do reagente foram utilizados 100 mg de Comassie blue G- 250 foi dissolvido em 50 mL de etanol 95%. A esta solução foi adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução resultante foi diluída para 1 litro com água destilada. As concentrações finais foram: 0,01% de Comassie, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. O reativo foi diluído 4 vezes (1 parte do reativo para 3 partes de água destilada) e finalmente filtrado com papel absorvente para utilização. Os resultados obtidos foram analisados a partir da curva padrão realizada para cada um dos grupos participantes, utilizando solução de soro albumina (0,1µmg/mL).

O procedimento para obtenção da curva padrão de proteínas a partir de uma solução de soro albumina bovina (BSA) (1mg/mL) foi o seguinte:

TABELA 1 - PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS

Tubos	Sol. Padrão de BSA	Água destilada (mL)	Reativo de Bradford (mL)
B	0,00	200	800
P2	20 (2µg/ul)	180	800
P4	40 (4µg/ul)	160	800
P8	80 (8µg/l)	120	800
P10	100 (100µg/ul)	100	800
P12	120 (120µg/ul)	80	800

Após o protocolo realizado, os tubos foram agitados em vórtex. Após 5 minutos, procedeu-se às leituras em espectrofotômetro de absorvância com comprimento de onda de 595 nanômetros (nm).

4.8.2 Determinação de Uréia Salivar:

A quantificação da uréia em mg/dL foi determinada pelo método colorimétrico via espectrofotômetro de absorvância através do comprimento de onda de 340 nanômetros (nm), utilizando kit *URÉIA UV Liquiform – Labtest diagnóstica®*, por fotometria em ultravioleta e cinética de dois pontos (tempo fixo). A uréia salivar é hidrolizada pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com o 2-cetoglutarato e NADH em uma reação catalizada pelo glutamato desidrogenase (GLDH), promovendo a oxidação do NADH a NAD (LABTEST, 2013). A consequente redução da absorvância medida em 340 nm é proporcional à concentração de uréia. O volume da amostra e reagente foi de 1 mL em cubetas de quartzo termoestabilizadas para leitura no espectrofotômetro, previamente ajustado para medir com exatidão a absorvância em 340nm e temperatura de 37°C. O cálculo utilizado para determinação da concentração de uréia salivar foi o seguinte:

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância padrão}} \times 70$$

4.8.3 Determinação de Cálcio Salivar

A quantificação do cálcio salivar em mg/dL foi mensurada pelo método colorimétrico Kit *CÁLCIO Liquiform – Labtest diagnóstica®*. O cálcio salivar reage com a púrpura de fnafeína em meio alcalino resultando em um complexo de cor violeta que é medido em espectrofotômetro calibrado em 570 nm.

A fórmula utilizada para a determinação da concentração do cálcio salivar foi a seguinte:

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância padrão}} \times 10$$

A absorvância é o termo utilizado para mensurar a quantidade de luz absorvida pela solução analisada. Os termos absorvância da amostra e absorvância padrão refere-se respectivamente á quantidade de luz absorvida pela saliva e pelo reagente padrão após a adição da púrpura de fnaleína. Ambas as soluções desenvolvem coloração característica e a relação expressa pela fórmula permite calcular a concentração de cálcio salivar.

4.8.4 Determinação do Fósforo Salivar:

A determinação do fósforo na saliva foi quantificada em mg/dL pelo método colorimétrico Kit *Fósforo Molibdato – Labtest diagnóstica®*. Os íons fosfato reagem com o molibdênio em meio ácido e formam um complexo amarelo, o qual é reduzido a azul-molibdênio pela ação de um tampão alcalino. O espectofotômetro foi calibrado no comprimento de onda 650 nm para a leitura dos dados. A interferência das proteínas é inibida pela solubilização em meio alcalino, que também acelera o desenvolvimento da cor.

A fórmula utilizada para a determinação da concentração dos íons fosfato salivar foi a seguinte:

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância padrão}} \times 5$$

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram transformados em mg/mL. Os dados registrados foram transferidos para uma planilha do software Excel for Windows 2010 e a análise estatística foi realizada com o software SPSS for Windows 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). O Teste *t de student* foi utilizado para avaliação da diferença na concentração das variáveis analisadas. A diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A amostra foi composta por 54 indivíduos divididos em dois grupos: 27 indivíduos dependentes químicos e 27 indivíduos não dependentes químicos. A média de idade do grupo de estudo foi de 37,56 anos ($\pm 10,70$) e do grupo não dependente químico foi de 38,15 ($\pm 11,12$). A Tabela 2 exibe a comparação entre as variáveis analisadas. O fluxo salivar e a concentração de uréia não apresentaram diferença estatística significativa, porém, proteínas totais, cálcio e fósforo apresentaram diferença significativa entre os grupos.

TABELA 2 - VALORES MÉDIOS DAS VARIÁVEIS FLUXO SALIVAR ESTIMULADO (FTSE), PROTEÍNAS TOTAIS, URÉIA, CÁLCIO e FÓSFORO ENTRE OS GRUPOS DEPENDENTE QUÍMICO E NÃO DEPENDENTE QUÍMICO. CURITIBA/PR, 2013

Variável	Dependentes químicos	Não Dependentes químicos	p
Idade (anos)	37,56 \pm 10,70	38,15 \pm 11,12	0,843
FSE (ml/min)	0,94 \pm 0,80	0,84 \pm 0,42	0,595
Proteínas totais (mg/mL)	0,45 \pm 0,31	0,28 \pm 0,22	*0,022
Uréia (mg/mL)	3,04 \pm 2,67	3,05 \pm 2,26	0,988
Cálcio (mg/mL)	0,12 \pm 0,06	0,05 \pm 0,04	*0,000
Fósforo (mg/mL)	0,78 \pm 0,22	0,55 \pm 0,17	*0,000

* $p < 0,05$ (diferença estatística)

Fonte: o autor (2014).

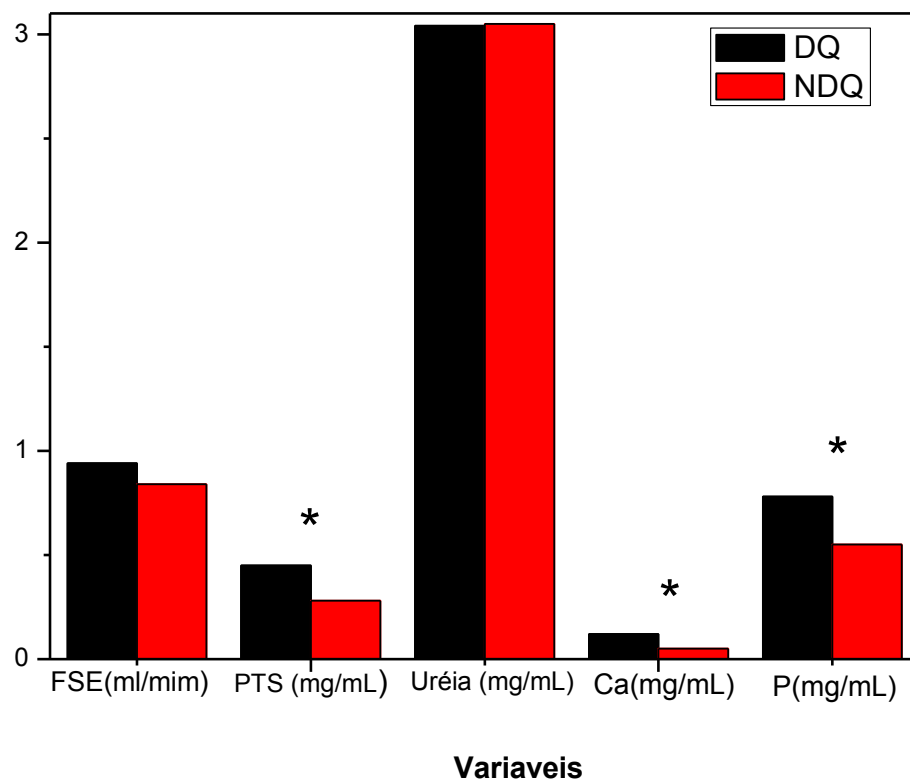


FIGURA 5: Comparação das variáveis do estudo entre os grupos.

Teste estatístico: t Student; ≠ estatística cálcio, fósforo e proteína DQ: dependentes químicos, NDQ: não dependentes químicos, FSE: fluxo salivar estimulado, PTS: proteínas totais, Ca: cálcio, P: fósforo.

FONTE: O autor.

6 DISCUSSÃO

A investigação deste estudo demonstrou alterações na composição salivar em dependentes químicos. Estudos abrangentes sobre dependentes químicos exploram em sua maioria o caráter depreciativo da droga e suas consequências fisiológicas a médio e longo prazo no indivíduo (GOSSOP *et al*, 2006). O interesse em buscar informações nas possíveis mudanças da composição salivar em dependentes químicos justifica este estudo devido a poucas pesquisas sobre esse aspecto.

A coleta da saliva estimulada fornece informações a respeito da capacidade secretória das glândulas salivares. A composição salivar da parótida humana é influenciada pela natureza do estímulo gustatório (AIRES *et al*, 2008). O estímulo ácido pode interferir na capacidade tampão e pode causar a precipitação de certas proteínas salivares e cálcio (DAWES, 1987). Este trabalho utilizou a estimulação mecânica com cera insípida, não havendo possibilidade da alteração na composição salivar para essa pesquisa.

O aumento significativo de proteínas totais, cálcio e fósforo no fluído salivar do grupo de estudo corresponde às explicações na literatura a respeito do controle do sistema nervoso central e autônomo nas glândulas salivares. A secreção das glândulas salivares é modificada qualitativa e quantitativamente diante dos estímulos nervosos simpático e parassimpático quando ocorre uso abusivo de drogas (KOOB, 1992; REEDY *et al.*, 2012). Estudos de GUBALA e ZUBA (2002) demonstraram que drogas são transferidas rapidamente do plasma para a saliva e, a concentração da droga no fluído salivar é proporcional ao do plasma, sendo possível a detecção de alterações na saliva de dependentes químicos. As drogas ilícitas aumentam a resposta do sistema simpático, sendo definidas como simpatomiméticas (CRAIG, 1986).

Os parâmetros salivares que apresentaram diferenças (proteínas totais, cálcio e fósforo) têm relação com o mecanismo nervoso autônomo na secreção salivar. O estímulo simpático tem efeito bifásico sobre a secreção salivar (AIRES, 2008). As fibras nervosas do sistema simpático liberam noradrenalina que se liga aos receptores α e β adrenérgicos. Os receptores β , cujo segundo mensageiro é o AMP cíclico (monofosfato cíclico de adenosina) estimula a

precipitação de enzimas e proteínas. Ocorre aumento da permeabilidade nas membranas das células acinares que contêm em seu interior, grânulos de zimogênio que são sítios de armazenamento de proteínas, secretadas em alta quantidade (TURNER, SUGIYA, 2002). O estímulo β adrenérgico resulta em aumento de proteínas e concentração de fosfato salivar (BEAL, 1989). Os receptores α adrenérgicos ativam substância P, receptor peptidérgico que atua como mediador do estímulo nervoso, presente na membrana da célula acinar. Isto resulta no aumento dos níveis de cálcio e abundante fluxo salivar, por potencializar o efeito da acetilcolina, neurotransmissor do SNPS (AIRES, 2008).

Mudanças na composição salivar de dependentes químicos têm relação com higiene bucal irregular e deficiente. A presença de biofilme patógeno aderido à superfície dental e em margem gengival, gengivite e periodontite propiciam respostas controladas pelo sistema simpático, que estimula o aumento da secreção de proteínas envolvidas com mecanismo de defesa, potencializando a proteção salivar aos tecidos orais. Proteínas presentes na saliva são derivadas das glândulas salivares, do fluído crevicular e da circulação sanguínea (HASHÓ, 2001; HENSKENS *et al*, 1996; SANCHEZ *et al*, 2013). Cálcio e fosfato estão associados com a manutenção da integridade do esmalte. Há maior risco de efeitos deletérios como cáries, erosão e abrasão dental nesses indivíduos, associados ao consumo frequente de carboidratos sem a devida higiene oral. Isto estimula a supersaturação desses íons no meio bucal (BUZZALAF *et al.*, 2011). Proteínas ricas em prolina e estaterina estão associadas com a inibição da precipitação de cálcio e fosfato e encontram-se dispostas em locais específicos para adsorção para proteção dental (BUZZALAF *et al.*; NAUNTOFT, 1998).

O álcool age como depressor do SNC e seus efeitos são potencialmente deletérios e irreversíveis ao SNC (GROBIN *et al.*, 2000). Acontece hiperpolarização em terminações nervosas por inibição da abertura dos canais de sódio sensíveis à voltagem dos neurônios. Atuam potencializando as ações do GABA (ácido gama-amino-butírico), o principal neurotransmissor inibitório do SNC (HOFFMAN; LITTLE, 1995). Ocorre aumento da síntese e liberação de noradrenalina pelos vasos sanguíneos das glândulas salivares (KOOB, 1992). O aumento da atividade nervosa simpática resulta na expulsão de saliva pré-formada consequente à contratilidade das células mioepiteliais. Há um aumento transitório do fluxo de saliva que sai pelos ductos de excreção das glândulas salivares, porém, o fluxo salivar diminui

definitivamente, resultante da vasoconstrição promovida pelo estímulo simpático (DOUGLAS, 1999; CRAIG, 1988). Nessa condição, o fluído salivar se torna mais espesso devido ao estímulo simpático adrenérgico por aumentar os efeitos da atividade nervosa simpática (CARPENTER, 2013). Consequentemente, a saliva pode apresentar menor fluidez e maior secreção de proteínas e cálcio. O estímulo α adrenérgico causa um influxo de cálcio nas células secretórias e resulta em secreção rica em mucina (APS, MARTENS, 2006). As ações dos estímulos adrenérgicos (noradrenalina) nos β receptores resulta maior secreção de proteínas salivares (TENOVUO, 1995). Outro fator relevante, é a relação abuso do álcool e risco de doença periodontal (REDDY *et al.*, 2012). O abuso de álcool causa elevação de citocinas inflamatórias TNF α (fator de necrose tumoral α) e interleucinas 1 e 6, estímulo do crescimento bacteriano patógeno, desencadeando inflamação gengival crônica e perdas ósseas verticais (AMARAL *et al.*, 2009). Há prejuízo da função dos macrófagos, neutrófilos e das células T (AMARAL *et al.*, 2009; REDDY, 2012). A concentração de proteínas salivares se eleva (principalmente cistatinas e imunoglobulinas) em resposta à vasoconstrição gerada e agressão da provável doença periodontal presente no indivíduo (SANCHEZ, 2013, REDDY, 2012; CHO, 2005). A hipótese do aumento da concentração de proteínas totais salivares causado pelo estímulo noradrenérgico provocado pelo etanol sugere a possibilidade da ocorrência desses mecanismos nas alterações constatadas dessa e das outras variáveis utilizadas para este estudo.

Dutta e colaboradores (1992) investigaram a relação do consumo crônico de álcool e a velocidade do fluxo salivar estimulado e composição salivar. Os resultados da pesquisa mostraram que a velocidade do fluxo da parótida estava associada à diminuição significativa da secreção de proteínas totais. Estes resultados sugerem alterações na fisiologia das glândulas salivares desses sujeitos.

Estudo de Enberg (2001) mostrou que o álcool estimula o aumento da secreção salivar no início da ingestão, alterando a composição da saliva, porém quando consumido de forma contínua e abusiva, causa diminuição do fluxo de saliva estimulada, resultando em baixa concentração de íons cálcio, fosfato e proteínas totais. A diferença dos resultados de Engberg (2001) pode ser explicada pelas diferenças no tempo de coleta da saliva, que ocorreu em três momentos (imediatamente após a ingestão de álcool, 45 minutos após a ingestão e 105 minutos após a primeira ingestão) em seu estudo. Imediatamente após a primeira

ingestão, a concentração de eletrólitos e proteínas totais foi maior que no grupo controle e nos dois últimos momentos, a concentração foi mais baixa. Os voluntários deste estudo não eram dependentes químicos. Em 2006, Brand e colaboradores concluíram que o fluxo salivar diminua discretamente após o consumo da cerveja com álcool. Waszkiewicz *et al.* (2013) associaram a pior condição periodontal aos alcoólatras fumantes de tabaco, pois estes apresentaram maior concentração de β -Hex A (proteína mediadora inflamatória secretada pelas células acinares e fluido gengival crevicular), correlacionando à presença de gengivite local. Essa enzima foi considerada como biomarcadora de doença periodontal pelos autores.

A maconha também afeta o SNC de maneira semelhante ao álcool. Apresenta efeito depressor e psicomimético. Os receptores muscarínicos (proveniente da acetilcolina) são receptores típicos acoplados à proteína G e produzem efeitos excitatório e de estimulação da secreção das glândulas salivares, ação semelhante à estimulação parassimpática (SMITH, 2004). Porém, o uso abusivo da maconha resulta em atividade anticolinérgica de diferentes intensidades. Eles bloqueiam os efeitos da acetilcolina sobre os receptores muscarínicos M_3 , resultando em diminuição da secreção salivar. Assim, predomina a estimulação simpática que leva à produção de saliva mais viscosa, pouco abundante e rica em proteínas e eletrólitos inorgânicos (RALEVIC, 2003). MC Connel *et al.* (1978) conduziram um estudo com animais mamíferos para observar os efeitos do delta 9 – THC nas glândulas salivares. Os autores constataram diminuição do volume do fluxo salivar devido à inibição da liberação de acetilcolina. Estudos farmacológicos de Baum e Wellner (1999) em glândulas salivares de ratos observaram secreção salivar mediada pelos receptores M_3 , o qual estimula o receptor α adrenérgico que age diretamente nos canais de cálcio, liberando cálcio do interior dos ácinos, havendo transporte de água precipitação de cálcio e fósforo na composição salivar. Em receptores β adrenérgicos houve ligação com proteína G e adenilciclase, geração de AMP cíclico, seguido da ativação de proteína quinase A e fosforilação de proteínas endógenas, desencadeando abundante extravasamento de proteínas salivares à partir dos grânulos de estoque de proteínas, via exocitose. Burnstock e Ralevic (1996) observaram que receptores canabinóides atuam como moduladores inibitórios nos terminais do sistema nervoso simpático, diminuindo o fluxo salivar. Christopoulos *et al.* (2001) verificaram em ratos que receptores cabinóides aumentavam significativamente a contração de células basais de vasos eferentes de

tecidos glandulares em 100% a 0,1 μ M e fluxo abundante de cálcio. A explicação suposta por esses autores foi a inibição dos agonistas endógenos mediados pela atividade de receptor cannabinóide, havendo secreção salivar com alto conteúdo protéico e eletrólitos (cálcio e fosfato). Estudos relatam evidências clínicas em usuários de *cannabis* como erosão dental, moderada periodontite crônica, eritema marginal gengival, candidíase oral e hiperplasia gengival (LAYMAN,1984; BADDOUR *et al.*,1984; DARLING, 1993; RAWAL, 2014). O THC pode apresentar efeito direto na imunossupressão de macrófagos e linfócitos T e B. O impacto é a diminuição da resistência do hospedeiro às infecções virais e bacterianas, diante da vasoconstrição resultante da fumaça inalada, estimulando inflamação crônica das mucosas (DARLING,1993; RAWAL,2014). É possível sugerir a partir desse suporte científico, a hipótese de alterações das variáveis apresentadas nesse estudo com relação à maconha.

A cocaína/crack inibe a captura de catecolaminas pelos transportadores de noradrenalina e dopamina aos terminais nervosos noradrenérgicos, potencializando intensamente os efeitos da atividade nervosa simpática. A cocaína/crack é droga simpatomimética de ação indireta, pois bloqueia o transporte de noradrenalina, serotonina e dopamina na fenda sináptica, ocorrendo prolongamento da sensação euforizante do usuário (DACKIS *et al.*, 2001). O sistema simpático adrenérgico estimula a contratilidade das células mioepiteliais, resultando na expulsão de saliva pré formada, aumentando transitoriamente o fluxo de saliva que sai pelos ductos de excreção das glândulas salivares, resultando em maior secreção de proteínas e íons cálcio. A hipótese para as mudanças da composição salivar se fundamenta nos estudos já realizados em animais mamíferos e humanos (ENBERG, 2001; PROCTOR, 2007; PICCIONE, 2006) que constatarem a atividade simpatomimética do crack/cocaína. Du *et al.* (2006) mostram em seus estudos com ratos, vasoconstrição em vasos eferentes que inervam as glândulas salivares e aumento de cálcio intracelular nos ácinos que desencadeia as reações bioquímicas responsáveis pela secreção muciginosa, rica em proteínas e cálcio, em consequência do uso da cocaína. O aumento de cálcio intracelular ocorreu devido à despolarização na membrana celular em resposta ao estímulo simpático. O estímulo adrenérgico causado pelo consumo da cocaína pode aumentar os níveis de cálcio intracelular, portanto eleva o influxo de cálcio intracelular e extracelular (DAKIS *et*

al., 2001). Woyceichoski *et al.* (2013) afirmam que capacidade tampão e fluxo salivar não se alteram em usuários de crack.

A uréia é um componente orgânico normal da saliva, utilizada como um indicador da síntese protéica e de possíveis danos sofridos pelas células acinares (MACPHERSON, DAWES, 1991). Os resultados da análise bioquímica da uréia não demonstraram diferença significativa entre os dois grupos. A hipótese para esse fato pode ser explicado pelo fluxo salivar avaliado por Bellani, (2013) não houve diferença significativa em suas análises. Segundo Douglas (1999), a concentração de uréia é dependente do fluxo salivar, portanto, se não houve variação do fluxo salivar entre os grupos, é possível afirmar que a concentração de uréia se manteve sem alteração nessa condição. A uréia viabiliza o aumento do pH bucal, porém a amônia (produto do metabolismo da uréia e aminoácidos do biofilme bucal) é potencialmente citotóxica para os tecidos gengivais (SLOTS *et al.*, 1984). Esta substância pode aumentar a permeabilidade do epitélio sulcular a outras substâncias antigênicas e tóxicas e promover a formação cálculo dental e desempenhar um papel no processo de iniciação da gengivite (SINGER *et al.*, 1978). Feller, Hyde e Suddick (1984) afirmam que a uréia, metabolizada pelas bactérias do biofilme, é capaz de neutralizar os ácidos produzidos pelas mesmas. É possível sugerir que os dependentes químicos não apresentam diferenças na concentração de uréia correlacionando sua ligação com fluxo salivar que não apresentou alteração e os resultados do estudo de Woyceichoski *et al.* (2013), o qual revelou inalteração da capacidade tampão.

Dependentes químicos apresentam estilo de vida irregular que influencia totalmente seus hábitos dietéticos, potencializando risco no desenvolvimento de doenças e alterações bucais. A associação de drogas com carboidratos e bebidas gaseificadas e açucaradas é frequente. Os cuidados com a higiene geral e bucal são secundários ou inexistentes (BASSIOUNY, 2013; CUGNO, 1981; RAWAL, 2014). Esse fato pode promover desmineralização do esmalte dental, situação em que há queda do pH. Os valores do pH bucal crítico entre 5,2 - 5,5 pode desencadear a dissolução de hidroxiapatita do esmalte, liberando cálcio e fosfato na saliva para manter a integridade do esmalte dentário. Estaterina e proteínas ricas em prolina agem simultaneamente, ligando-se aos íons cálcio e fosfato para inibir sua precipitação espontânea. Geralmente, o pH bucal de dependentes químicos está constantemente baixo, fato que diminui a capacidade da remineralização, aumenta o

potencial de proliferação de microbiota patogêna, promovendo aparecimento de lesões cáries e erosivas (PUY, 2006). Erosão dental pode estar associada a constantes vômitos, expondo a superfície dental ao ácido gástrico, seja pela intoxicação pela droga ou em fase de abstinência (BUZALAF *et al.*, 2011; RAWAL, 2014).

Uma limitação importante deste trabalho foi o englobamento dos diversos tipos de drogas ilícitas para a análise salivar. Há muitos relatos na literatura de dependentes químicos que fazem uso de diferentes tipos de drogas ilícitas (CHAO, NESTLER, 2004; GOSSOP, 2006), porém escasso número que abordasse a relação bioquímica bucal e usuários de drogas ilícitas. Esse estudo é o primeiro que avalia a relação do uso crônico do poliuso de drogas ilícitas e influência na composição salivar, investigando os parâmetros citados. Sugestão para futuros estudos propondo dois grupos de indivíduos dependentes de drogas ilícitas de natureza similar é relevante, como maconha e álcool, classificadas como depressoras, crack e outros estimulantes em outras pesquisas, propondo dados comparativos. Em contrapartida, há extrema dificuldade na seleção de indivíduos que consumam apenas um tipo de droga, pois há o predomínio da associação de outras drogas, seja com o objetivo de potencializar ou inibir o efeito entre elas (PEDREIRA, 1999). É relevante pontuar que a combinação do uso simultâneo de drogas como álcool, que é depressor e, cocaína (crack), que é estimulante pode ter sido determinante para resultados divergentes aos estudos de Dutta (1992) e Enberg (2001). A amostra de estudo desses autores foi composta por indivíduos que consumiam somente álcool. A cocaína e o crack atenuam os efeitos depressores do álcool e este inibe os efeitos tóxicos de hiperatividade da cocaína (GOSSOP *et al.*, 2006; CARLINI, 2005).

Um dado relevante dessa pesquisa foi a fase em que ocorreu a coleta da saliva. A eleição da escolha das amostras analisadas foi o período do início do tratamento de desintoxicação, momento em que pode ocorrer abstinência pela ausência da droga. Os indivíduos escolhidos para o estudo internados no IPTA compõe uma população que supostamente seja diferente de indivíduos usuários dependentes que não interromperam o uso das substâncias psicoativas no que diz respeito às características bioquímicas da saliva. A abstinência aumenta o estresse, ansiedade e é possível ocorrer maiores mudanças nas concentrações eletrolíticas e protéicas (D'AMORE *et al.*, 2011; APS, MARTENS, 2006). Durante a síndrome da

abstinência, principalmente alcoólica, ocorrem episódios de vômito, que expõe o indivíduo a mudanças importantes na composição salivar (D'AMORE *et al*, 2011).

O fator estresse não abordado nessa pesquisa pode ter influenciado os resultados desse estudo. O estresse é um fator modulador das respostas do Sistema nervoso autônomo e potencial variável para mudanças das concentrações das outras variáveis estudadas. Bellani (2013) observou em seu estudo que a ansiedade dos indivíduos foi maior no início do tratamento de desintoxicação, fator esse que pode ser determinante para os resultados desse estudo, pois o estresse estimula a resposta do sistema simpático, responsável pela liberação de catecolaminas adrenérgicas (DOUGLAS, 1999).

Futuros estudos podem englobar um maior número da população de estudo e abordar outras variáveis na composição salivar. O acompanhamento longitudinal pode ser sugerido para detalhar as alterações que podem ocorrer a longo prazo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que:

- a) Dependentes químicos na fase inicial da desintoxicação apresentam maiores concentrações de proteínas totais, íons cálcio e fósforo em salivação estimulada .
- b) O fluxo salivar estimulado e a concentração de uréia salivar encontrada estão dentro dos parâmetros normais para ambos os grupos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, N.L. *et al.* **Screening for problem drinking in older primary care patients**, Journal of the American Medical Association, v. 24, n. 276, pp. 1964-67. 1996.

AIRES, M.M. *et al.* **Fisiologia**. 3ª ed. Ed Guanabara, v.2, cap 58, p. 827-837, 2008.

ALBINI, M. B. **Condição periodontal de usuários de drogas**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

AMARAL, C.S. F.; VETTORE, M. V.; LEÃO, A. **The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a sistematic review**. Journal of Dentistry, v. 37, pp. 643-51, 2009.

AMBUDKAR, I.S. **Polarization of Calcium Signaling and Fluid Secretion in Salivary Gland Cells**. Current Medical Chemistry, v. 19, n. 34, pp. 5774–81, 2009.

AMERONGER A.V.N. **Vorming en secretie van speeksel**, in: A. van Nieuw Amerongen (Ed.), Speeksel, speekselklieren en mondgezondheid, Bohn Stafleu Van Loghum, Houten, v.1, pp. 23–36, 2004.

ANDERSON, B.; FARROW, J.A. **Incarcerated adolescents in Washington State**. Health services and utilization, Journal Adolescence Health, v. 22, n. 5, pp. 363-7, 1998.

ANTONIAZZI, R.P. *et al.* **Effects of crack cocaine in oral conditions**: Literature Review, Brazilian Journal of Periodontology, v.23, n 1, pp. 13-18, March, 2013.

APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. **Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva**. Forensic Science International. Science direct Elsevier, v. 150 pp. 119-131, 2005.

BADDOUR, H. M.; LAYMAN, F. D. **The occurrence of diffuse gingival hyperplasia in a patient using marijuana**. Journal Tennessee Dental Association, v. 64, pp. 39-43, 1984.

BALDWIN, G.C., BUCKLEY, D.M., ROTH, M.D., KLEERUP, E.C., TASHKIN, D.P. **Acute activation of circulating polymorphonuclear neutrophils following in vivo administration of cocaine. A potential etiology for pulmonary injury.** Chest Journal, v. 111, n. 3, pp. 698-705, March, 1997.

BANDERAS TARABAY, J.A.. **Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana.** Salud Publica Mexicana, v. 39, n. 5, pp. 433-41, 1997.

BARRACO, L.C.; SCHIMITZ, J.M. **Drug preference in cocaine and alcohol dualdependent patients.** American Journal Drug Alcohol Abuse, v. 34, pp. 211-7, 2008.

BASSIOUNY, M.A. *et al.* **Dental erosion due to abuse of illicit drugs and acidic carbonated beverages.** European Journal of General Dentistry, v.61, n.2, pp. 38-44, 2013.

BAUM, B.J.; WELLNER, R.B. **Receptors in salivary glands.** In: Garrett, J.R., EKSTRON, J., ANDERSON, L.C. (Eds.), Neural Mechanisms of Salivary Secretion v. 3. Karger, Basel, pp. 44–58, 1999.

BAYNES, J; DOMINICZAC, M.H. **Bioquímica médica.** São Paulo. Ed.Manole.v.1 2000. 556p.

BEAR, MF; CONNORS BW; PARADISO MA. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso,** 2ª Ed.- Porto Alegre, Artmed, v.4, 2002.

BEAL, A.M. **Effect of phosphate regulating hormones on plasma composition cardiovascular functions and parotid salivary phosphate secretion in red kangaroos.** General and comparative endocrinology, v.81, pp. 64-71, 1991.

BECCIOLONI, A., GIANARDDI, G., CIONINI, L. *et al.* **Plasma amylase activity as a biochemical indicator of radiation injury to salivary glands.** Acta Radiologica Oncology, v. 23, pp. 9-14, 1984.

BELLANI, W.A.G.O. **Níveis de ansiedade, depressão, velocidade do fluxo e amilase salivar de dependentes químicos em tratamento para desintoxicação.** 90 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Secreções gastrointestinais.** In **Fisiologia.** 3ªed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, v.1, pg. 616-648, 1993.

BIKLE, D.D. **Alcohol induced bone disease.** World Review Nutritional Diet. v. 73. pp. 53-76, 1996.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v. 72, pp.248-254, 1976.

BRAND, H. S. *et al.* **Cocaine and oral health.** British Dental Journal, v. 204, n. 7, pp. 365-8, 2008.

BULLOCK , K. **Dental care of patients with substance abuse.** Dentistry Clinical North American. v.43, n.3, pp.513-26, Jul., 1999.

BURNSTOCK, G., RALEVIC, V. **Cotransmission.** In: Garland, C.J., Angus, J. (Eds.), The Pharmacology of Vascular Smooth Muscle. Oxford University Press, Oxford, v.5, pp. 210-32, 1996.

BUSSE, G.D., LAWRENSE, E.T., RILEY, A.L. **The modulation of cocaine-induced conditioned place preferences by alcohol: effects of cocaine dose.** Prog Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry, v. 28, pp. 149-55, 2004.

BUZZALAF, M.A.R *et al.* **Saliva and dental erosion.** Journal Applied Oral Science. v. 20,n.5, pp. 493-500, 2012.

CABRAL, G.A. **Drugs of abuse, immune modulation and AIDS.** Journal Neuroimmune Pharmacology, v.1, n. 3, pp. 280-95, 2006.

CARLINI, E.A., GALDUROZ, J.C.F., NOTO, A.R., FONSECA, A.M., CARLINI, C.M., OLIVEIRA, LG *et al.* **II Levantamento Domiciliar sobre o uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país –.** São Paulo, 2005.

CARLINI EA, GALDUROZ JCF, NOTO AR, FONSECA AM; CARLINI CM, OLIVEIRA LG *et al.* **II Levantamento Domiciliar sobre o uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país,** São Paulo, 2011.

CARPENTER, G.H. **The secretion components and properties of saliva** Annual. Reviews Food Science Technology, v.4, pp. 267-76, 2013.

CARPENTER, G H; PROCTOR, G B. **Regulation of Salivary gland function by autonomic nerves Review.** Salivary Research Unit College London Dental Institute -Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical. v.133, pp.3-18, 2007.

CEBRID Centro Brasileiro de Informações sobre **Drogas Psicotrópicas**, Departamento de Psicobiologia, UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 468 f., 2007.

CASTAGNOLA, M., PICCIOTTI, P.M., MESSANA, I., FANALI, C., FIORITA, A., CABRAS, T., CALO, L., PISANO, E., PASSALI, G.C., LAVARONI, F., PALUDETTI, G, SCARANO, E. **Potential applications of human saliva as diagnostic fluid.** Acta Otorhinolaryngol Italian. v.31, n.6, pp. 347-57, 2011.

CEBRID Centro Brasileiro de Informações sobre **Drogas Psicotrópicas** da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). <http://www.uniad.org.br/index.php> acessado em maio 2013.

CHAO, J.; NESTLER, E.J. **Molecular Neurobiology of drug addiction** Annual Review Medical. v.55, pp. 113-32. Department of Psychiatry and Center for Basic Neuroscience, The University of Texas, Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, Texas 75390-9070; email: eric.nestler@utsouthwestern.edu, 2004.

CHAUDHARI, N.; ROPER, S.D. **The cell biology of taste** Journal Cell Biology. v.2 n.19, pp. 285-96, 2010.

CHENG, K.T.; LIU, H.; HONG, H.L.; SWAIM, W.; AMBUDKAR, I.S. **Local Ca²⁺ entry via Orai 1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca²⁺ signals required for specific cell functions.** Plos Biology, v.9, pp.100-25, 2011.

CHO, C.M.; HIRSCH, R; JOHNSTONE, S. **General and oral health implications of cannabis use.** Australian Dentistry Journal. v.50, n.2, pp.70-4, 2005.

CHOU, P. S.; HAE, K.; LEE, J.; MAENG, J.; CHO, P.; JONK-IK P., DAWSON, GRANT, B.F. **Alcohol Use Disorders, Nicotine Dependence, and Co-Occurring Mood and Anxiety Disorders in the United States and South Korea: A Cross-**

National Comparison Alcoholism: Clinical and Experimental Research, v.36, n.4, pp 654-62, April, 2010.

CHRISTOPOULOS, A; COLES, P., LAY, L., LEW, M.J., ANGUS, J.A. **Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens.** Brazilian Journal Pharmacology. v.132, pp. 1281–91, 2001.

COLODEL, E.V.; SILVA, E.L.F.M.; ZIELAK, J.C.; ZAITTER, W.; CROSATO, M. E.; PIZZATO, E. **Alterações bucais presentes em dependentes químicos.** Revista Sul Brasileira de Odontologia. v. 61, pp. 44-8, 2009.

CONGWU, D.U., MEI, Y.U., NORA, D.; VOLKOW,. K; KORETSKY, A. P., FOWLER, J S, BENVENISTE, H. **Cocaine Increases the Intracellular Calcium Concentration in Brain Independently of Its Cerebrovascular.** Effects Neurobiology of Disease. The Journal of Neuroscience, v.26, n.45, pp.11522–31 nov., 2006.

COWMAN, R.A.; BARON, S.S.; GLASSMAN, A.H. *et al.* **Changes in protein composition of saliva from radiationinduced xerostomia in patients and its effects on growth of oral streptococci.** Journal Dentistry Research. v.62, pp.336-40, 1983.

CRAIG, CR ; STITZEL, R.E. **Modern Pharmacology.** Issue1, pp. 36 -118, 1986.

CUGNO, F.; PEREC, D.; TOCCI, A.A. **Salivary secretion and dental caries experience in drug addicts.** Archives Oral Biology. v.26, pp. 363-67,1981.

CURRIE, C. *et al.* **Social determinants of health and well-being among young people: Health Behaviour in School-Aged Children (HBSC) study: international report from the 2009/2010 survey.** Copenhagen: World Health Organization WHO Edinburg: University of Edinburgh, Child and Adolescent , v.2, 2009/2010.

D'AMORE, M.M.; CHENG, D.M.; KRESSIN, N.R.; JONES, J.; SAMET, J.H.; WINTER, M. *et al.* **Oral health of substance-dependent individuals: impact of specific substances.** Journal of Substance Abuse Treatment. v.41, n.2, pp.179-85, Sep 2011.

DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P. **Cocaine dependence: a disease of the brain reward centers.** Journal of Substance Abuse Treatment. v.21, pp.111-17, 2001.

DARLING, M. R.; ARENDORF, T. M. **Effects of cannabis smoking on oral and tissues.** Community Dentistry Oral Epidemiology, v.21, pp. 78-81, 1993.

DASANAYAKE, A.P. *et al.* **Tooth decay in alcohol abusers compared to alcohol and drug abusers.** International Journal of Dentistry. v.2, pp.1-6, 2010.

DAWES, C. **Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man.** Journal Dentistry Research. v.66, pp. 648-53, 1987.

DEGENHARDT, L.; DIERKER, L.; CHIU, W.U. *et al.* **Evaluating the drug use “gateway” theory using cross-national data: consistency and associations of the order of initiation of drug use among participants in the WHO World Mental Health Surveys.** Drug Alcohol Dependence. v.108, pp 84–97, 2010.

DEGENHARDT, L.; CHIU, W.T.; SAMPSOM, N., *et al.* **Toward a Global View of Alcohol, Tobacco, Cannabis and Cocaine use: Findings from the WHO World Mental Health Surveys.** Plos Medicine. v.5, pp.141, 2009.

DEGENHARDT, L.; HALL, W. **Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease.** The Lancet. v.7, pp.379, 2010.

DEVLIN, R.J.; HENRY, J.A. **Clinical Review: Major consequences of illicit drug consumption.** Critical Care. v.12, n.1, pp.202, 2008.

DEWHIRST, F.E.; CHEN, T.; WADE, W.G. **The Human Oral Microbiome** Journal Bacteriological. v.192, n.19, pp. 5002–17, October, 2010

DOUGLAS, C.R. – **Tratado de Fisiologia aplicada às ciências da saúde** 4ª edição, ed. Robe, São Paulo, v.1, pg. 897-907, 1999.

DUALIBI, L.B. ; RIBEIRO, M.; LARANGEIRA, R. **Profile of cocaine and crack users in Brazil.** Cadernos de. Saúde Pública. v.24, n.4, pp. 56-9, 2008.

DUTTA, S.K.; ORESTES, M.; VENGULEKUR, S., KWO, P. **Ethanol and human saliva: effect of chronic alcoholism on flow rate, composition and epidermal growth factor.** American Journal Gastroenterology. v.87, n.3, pp.350-4, mar, 1992.

ENBERG, N. *et al.* **Saliva flow rate, amylase activity and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption.** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiologica Endodontics. v.92, n.3, pp.292-8. University of Turku and Public Health Institute, Helsinki, Finland, 2001

ERICSON, T.; MAKINEN, K.K. **Saliva: Formação, composição e possível função.** In: Thylstrup, A; Fejerskov, O. Tratado de Cariologia. Rio de Janeiro. Cultura médica. v.2, pg. 16-19, 1998.

FERREIRA, O.F.; TURCHI, M.D.; LARANJEIRA, R.; CASTELO, A. **Perfil sociodemográfico e padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados.** Revista de Saúde Pública, v.37, pp.751-59, 2003.

FLEMING, M.; MIHIC, S. I.; HARRIS, R. A. **Etanol.** In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. Godman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Ed. New York, v.10 pp. 325-37, 2003.

FONSECA, M.A. **Substance Use Disorder in Adolescence: A Review for the Pediatric Dentist.** Journal of Dentistry for Children, v.76, n.3, pp.209-16, 2009.

FRIEDLANDER, A.H.; GORELICK, D.A. **Dental management of the cocaine addict.** Oral Surgery Oral Medicine Pathology. v. 65, pp. 45-8, 1998.

FRIEDLANDER, A.H.; MARDER, S.R.; PISEGNA, J.R.; YAGELA, J.A. **Alcohol abuse and dependence: psychopathology, medical management and dental implications.** Journal American Dentistry Association. v.134, n. 6, pp. 731-40, 2003.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. **Farmacologia Clínica.** Fundamentos da terapêutica racional. v.4, 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GARCIA, M.A.T.; KANAAN, S. **Bioquímica Clínica.** São Paulo: Editora Atheneu, Universidade Federal Fluminense, v.1, pg. 49-60, 2008.

GARRET, R.H.; GRISHAN, C. M. **Molecular aspects of cell biology.** Sounders College Publishing, v.1, pp 1-4, 1995.

GAUTAM, D.; HEARD, T.S.; CUI, Y.; MILLER, G.; BLOODWORTH, L.; WESS, J. **Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3**

muscarinic receptor single and double-knockout mice. Journal Molecular Pharmacology. v.66, pp.260-67, 2004.

GENOVESE, W. **Exame clínico em Odontologia.** São Paulo. Panamedical, v.3, pg. 319, 1985.

GOLD, M.S. **The neurobiology of cocaine.** In: **Cocaine.** Plenum Medical Book Company, ed. New York, v. 4, pp. 34-47, 1993.

GOSSOP, M.; MANNING, V.; RIDGE, G. **Concurrent use and order of use of cocaine and alcohol: behavior differences between users of crack cocaine and cocaine powder.** Addiction Journal. v.101, pp. 1292-8, 2006.

GRIFFITHS, P., MONTENEY, J., LOPEZ, D., ZOBEL, F., GÖTZ, W. **Addiction research centres and the nurturing of creativity. Monitoring the European drug situation: the ongoing challenge for the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA).** Addiction Journal. v.107, pp.254-8, 2012.

GUBALA, W.; ZUBA, D. **Saliva as an alternative specimen for alcohol determination in the human body.** Poland Journal Pharmacological. Warsaw. v. 54, pp. 161-5, 2000.

GUPTA, S.; SHAH, N.; MATHUR, V.P.; DHAWAN, A. **Oral health status of a group of illicit drug users in Delhi, India.** Community Dentistry Health. v. 29, n.1, pp.49-54, 2012.

GUYTON, A.C.; HALL, M.D. **TRATADO DE FISILOGIA MÉDICA** 11ª edição, v.5, Ed. Elsevier. pg. 748-759, 2006.

HALL, W.; LYNSKEY, M. **The challenges in developing a rational cannabis policy.** Current Opinion Psychiatry. v. 22, n. 3, pp. 258-62, 2009.

HARRIS, C.K. **Dental, oral and nutritional status of people misusing drugs including alcohol** in: Department of Dental Public Health and Oral Health Services. v.20, pp 150, 2002.

HARVEY, N.M., CARPENTER, G.H., PROCTOR, G.B., KLEIN, J. **Normal and frictional interactions of purified human statherin adsorbed on molecularly-smooth solid substrata.** Biofouling Journal. v. 27, n. 8, pp. 823–35, 2011.

HASKÓ, G. **Receptor mediated interaction between the sympathetic nervous system and immune system in inflammation.** *Neurochemistry Research*. v 26, pp 1039-44, 2001

HAY, D.I.; SCHLUCKEBIER, S.K.; MORENO, E.C.. **Saturation of human salivary secretions with respect to calcite and inhibition of calcium-carbonate precipitation by salivary constituents.** *Calcified Tissue International*. v.39, n.3, pp. 151-60, 1986 .

HATITASKOS, P.; SOLDATOS, C.R.; KOKKEVI, A.; STEFANIS, C.N. **Substance abuse patterns and their association with psychopathology and type of hostility in male patients with borderline and antisocial personality disorder.** *Comprehensive Psychiatry*. v. 40, pp. 278-82, 1999.

HENSKENS, Y.M.C. *et al.* **Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subject.** *Journal Periodontal Research*. v.31, pp 57-65, 1996.

HOFMAN, L.F. **Human saliva as a diagnostic specimen. Symposium: innovative non- or minimally invasive technologies for monitoring health and nutritional status in mothers and young children.** *American Society Nutrition Science*. v.45, pp. 1621–25, 2001.

HOFFMAN, M.P.; FERREIRA, J.N. **Interactions between developing nerves and salivary glands.** *Organogenesis Bioscience*. v.9, n. 3, pp. 199-207, 2013.

HONG, J.H.; LI, Q.; KIM, M.S.; SHIN, D.M.; FESKE, S.; BIMBAUMER, L; CHENG, K.T.; AMBUDKAR, I.S.; MUALLEN, S. **Polarized but Differential Localization and Recruitment of STIM1, Orai1 and TRPC Channels in Secretory Cells.** v.12, pp. 232-45, 2011.

HU, M.; BECKER, J.B. **Sex Differences in Drug Abuse.** *Frontiers in Neuroendocrinology Journal*. v.29, n.1, pp. 36–47, 2008.

HU, S.; ARELLANO, M.; BOONTHENG, P., *et al.* **Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery.** *Clinical Cancer Research*. v.14, pp.6246-52, 2008.

HUESTIS, M.A.; MITCHELL, J.M.; CONE, E.J. **Detection times of marijuana metabolites in urine by immunoassay and GC-MS.** *Journal of Analytical Toxicology*. v.19, pp.443-9, 1995.

HUMPHREY, S.P., WILLIANSO, R.T. **A review of saliva: normal composition, flow, and function.** Journal of Prosthetic Dentistry. v.85, pp.162-9, 2001.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) **PENSE 2012** Web (www.ibge.com.br), 2013

IDKAIDEK, NASIR; ARAFAT, TAWFIQ **Saliva versus plasma pharmacokinetics: Theory and Application of a Salivary Excretion Classification System.** Molecular Pharmaceutics American Chemical Society. v.9, pp. 2358-63, 2012.

IKAWA, M., HECTOR, M.P., PROCTOR, G.B. **Parotid protein secretion from the rabbit during feeding.** Experimental Physiology. v.76, n.5, pp. 717–24, 1991.

JONES, R.T. **Human effects: an overview.** In: Petersen RC, Marijuana Research Findings. Rockville: DHHSNIDA; v.34, pp. 54-80, 1980.

KALANT, H. **Medicinal use of cannabis: history and current status.** Pain Research Management. v.6, pp.80-91, 2001.

KALIVAS, P.W.; VOLKOW, N.D. **The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice.** American Journal Psychiatry. v.162, pp. 1403-13, 2005.

KIDWELL, D.A., HOLLAND, J.C., ATHANASELIS, S. **Testing for drugs of abuse in saliva and sweat.** Journal Chromatographic Science Applied. v.22, n.721(2), pp 333. Chemistry Division, U.S. Naval Research Laboratory, Washington, DC 20375, USA, Jan., 1999.

KNACKSTEDT, L.A.; ETTEBERG, A. **Ethanol consumption reduces the adverse consequences of self-administered intravenous cocaine in rats.** Psychopharmacology Journal. v.178, pp. 143-50, 2005.

KOOB, G. F. **Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways.** Trends Pharmacology Science. v. 13, pp.177-84, 1992.

KRASSE, B **Biological factors indicators of future caries** International Dentistry Journal. v. 38, pp. 219-225, 1988.

KUO, I.; GREENBERG, A.E.; MAGNUS, M.; PHILLIPS, G.; RAWLS, A.; PETERSON, J. *et al.* **High prevalence of substance use among heterosexuals living in**

communities with high rates of AIDS and poverty in Washington, DC. Drug Alcohol Dependent Journal. v.1, n.117 (2-3), pp. 139-44, Sep., 2011.

LAWRENCE HP. **Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health.** Journal of Canadian Dental Association. v.68, pp. 170-4, 2002.

LAYMAN, F. D. **Marijuana: harmful or not?** Dentistry Journal. v.96, pp. 6-8, 1978.

LEE, C.Y.S.; MOHAMMADI, H.; DIXON, R.A. **Medical and dental implications of cocaine abuse.** Journal Oral Maxillofacial Surgery. v.49, pp.290-93, 1991.

LEMANN, J.J. **Calcium and phosphate metabolism: An overview in health and in calcium stone formers.** In: Coe F.L, Favus MJ, Pak CY, Parks JH, Preminger G. M, eds. Kidney Stones: Medical and Surgical Management. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, v.68, pp. 345-47, 1996

LIÉBANA, J, GONZÁLEZ, M.P., LIÉBANA, M.J., PARRA, L. **Composición y ecología de la microbiota oral.** En: Liébana J, ed. Microbiología oral . 2ª ed. Madrid. MacGraw- Hill- Interamericana, v.29, pp. 515-25, 2002.

LIMA, E.C.; SILVA, C.L. **Cabelo como matriz analítica alternativa para a determinação de drogas de abuso.** Revista NewsLab. v.82, pg. 156-169, 2007.

LITTLE, K.Y., PATEL, U.N., CLARK, T.B., BUTS, J.D. **Alterations of the brain dopamine and serotonin levels in cocaine users: a preliminary report.** American Journal of Psychiatry. v. 153, n.9, pp. 1216-8, 1996.

LOO, J.A.; WONG, D.T.; YAN, W.P. **Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes.** Journal Dentistry Research. v.89, n.10, pp.1016-23, 2010.

LUO, W.; LATCHNEY, L.R.; CULP, D.J. **G protein coupling to M1 and M3 muscarinic receptors in sublingual glands.** American Journal Physiology. v. 280, pp. 884-96, 2001.

LUR, G.; HAYNES, L.P.; PRIOR, I.A.; GERASIMENKO, O.V.; FESKE, S.; PETERSEN, O.H.; BURGOYNE, R.D.; TEPIKIN, A.V. **Ribosome-free terminals of rough ER allow formation of STIM1 puncta and segregation of STIM1 from IP(3) receptors.** Current Biology. v.19, pp.1648–53, 2009.

MC CONNEL, W.R.; DEWEN, W.L.; HARRIS, L.S.; BORZELLECA, J.F. **A study of the effect of delta 9-tetrahydrocannabinol (delta9-THC) on mammalian salivary flow**). Journal Pharmacological Experiment Therapy. v.206, n.3, pp.567-73, 1978.

MC DOWELL, R. L. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press Journal.v.7, pp 524, 1992MACPHERSON, L.M.; DAWES, C. **Urea concentration in minor mucous gland secretions and the effect of salivary film velocity on urea metabolism by Streptococcus vestibularis in an artificial plaque**. Journal Periodontal Research. v.26, pp. 395-401, 1991.

MAGURA, S., ROSEMBLUM, A. **Modulating effect of alcohol use on cocaine use**. Addict Behavior Journal. v.25, pp.117-22, 2000.

MANDEL, I.D. **Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands**. CRC Critical Review Clinical Laboratory and Science. v.11, pp. 321-66, 1980.

MASTERS, S.B. **Os álcoois in: Farmacologia básica e clínica**. 8ª edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Cap.23.v.54, pg. 334-345, 2003.

MATSUO, R; GARRET,J.R.; PROCTOR, G.B.; CARPENTER, G.H. **Reflex secretion of proteins into submandibular saliva in conscious rats, before and after preganglionic sympathectomy**. Journal of Physiology (London). v.527, n.1 pp.175-8, 2000.

MATSUO, R. **Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity**. Critical Review Oral Biology and Medicine. v.11, n. 2, pp 216–29, 2000.

MELVIN, J.E.; YULLE, D.; SHUTTLEWORTH, T.; BEGENISICH, T. **Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells**. Annual Review Physiology. v.67, pp. 445-69, 2005.

MICKENAUTSCH et al. **Measurement of dental restorative material topography**. Journal Dental of Africa Association. v. 60, n. 6, pp.242-4, 2005.

MILROY, C.M., PARAI, J.L. **The histopathology of drugs of abuse**. Histopathology. v.59, n. 4, pp. 579-93, Oct., 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A Política do Ministério da Saúde para Atenção Integral a Usuários de Álcool e outras Drogas**. 2004

MINISTÉRIO DA SAÚDE **Sistema Integrado de informatização de ambiente Hospitalar.** Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATSUS/Index.php?Area=0405>. Acesso em 15/ 08 /2013

MITCHELL-LEWIS, D.A., PHELAN, J.A., KELLY, R.B., **BRADLEY, J J, LAMSTER IB. Identifying oral lesions associated with crack cocaine use.** Journal American Dentistry Association. v.125, n.8, pp.1104-8, 1994.

MOLINA, P.E. **Fisiologia Endócrina.** 2ª edição. São Paulo: McGraw Hill, v.8, pg.87-116, 2007.

NAUNTOFT, B., TENEVUO, J.O., LAGERLOFT, F. **Secretion and composition of saliva.** In: FEJERSKOV O and KIDD E, eds. Dental Caries. The disease and its clinical management. Oxford. Blackwell Munksgard. v.5, pp.7-29, 2003.

NAVADESH, M. **Methods for collecting saliva.** Annual NewYork Academy Science. v. 694, pp. 72-77, 2002.

NAVAZESH M. *et al.* **Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in health Caucasian young and aged adults.** Journal Dentistry Research, Washington. v. 71, n.6, pp.1275-8, 1997.

NEIDLE, E.A.; YAGELA, J.A. *et al.* **Pharmacology and therapeutics for dentistry.** 6th, ed. Elsevier Inc., v.6, pp 130-58, 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M.: **Principles of Biochemistry.** 3ed. New York: Worth Publishers, v.37, pp.1152, 2000.

NOTO, A.R., GALDURÓZ, J.C., NAPPO, S.A., FONSECA, A.M., CARLINI, C.M., MOURA, Y.G., *et al.* **Levantamento nacional sobre uso de drogas entre crianças e adolescentes em situação de rua nas 27 capitais brasileiras 2003** São Paulo: SENAD / CEBRID 2003.

OBID [www.obid.senad.gov.br/](http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/index.php) portais/OBID/index.php maio 2011

OLIÉRE, S.; RIOPEL, A.J.; POTVIN, S.; ASWARD, D.J. **Modulation of the endocannabinoides system: vulnerability factor and new treatment target for stimulant addiction.** Frontiers of Psychiatry: Addictive Disorders and Behavior Dyscontrol. v.4, n.109, pp.1-21, 2013.

OLIVEIRA, L.G.; NAPPO, S.A. **Characterization of the crack cocaine culture in the city of the São Paulo: a controlled pattern of use.** Public Health Journal. v. 42 pp. 664-71, 2008.

OLIVEIRA, T.C. **Fósforo: função, metabolismo e recomendações**. Revista Digital de Nutrição – Ipatinga: Unileste-MG. v.1, n.1, pg. 34-7, ago/set 2007.

PAJUKOSKI, H.; MEURMAN, J.H.; SNELLMAN, C.; GROHN, S.; KEINANEN, S.; SULKAVA, R. **Salivary flow and composition in elderly patients referred to an acute care geriatric ward.** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiologica Endodontic. v.84, pp.265-71, 1997.

PARRY, J.; PORTER, S.; SCULLY, C.; FLINT, S.; PARRY, M. G. **Mucosal lesions due to oral cocaine use.** Brazilian Dentistry Journal. v.180, n.12, pp. 462-4, 1996.

PATTON, G. C. *et al.* **Global patterns of mortality in young people: a systematic analysis of population health data.** The Lancet, Amsterdam: Elsevier. v.374, n. 9693, pp. 881-92, Sep.,2009.

PEDREIRA, R.H.S.; REMENCIUS, L.; NAVARRO, M.F.L.; TOMITA, N.E. **Condições de saúde bucal de drogaditos em recuperação.** Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo. v.13, n.4, pp. 395-9, 1999

PELLEGRINO, T., BAYER, B.M. **In vivo effects of cocaine on immune cell function.** Journal Neuroimmunological. v.15, n. 83 (1-2), pp.139-47, March,1998.

PINHEIRO, CE **Bioquímica da saliva**. Revista paulista de Odontologia, v.3, pg.41-50, 2000.

PUTNEY, J.W; BROAD, L.M.; BRAUN, F.J.; LIEVREMONT, J.P.; BIRD, G.S. **Mechanisms of capacitative calcium entry.** Journal Cellular Science. v.114, pp. 2223–29, 2001.

PUY, L. C. **The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis.** Medicine Oral Patology Oral Surgery Bucal. v.11, pp.449-55.© Medicina Oral. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-6946, 2006.

RALEVIC, V. **Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission.** European Journal of Pharmacology. v. 472, pp. 1– 21, 2003.

RANG, H.P. *et al.* **Farmacologia**. v.8, 6ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, pg. 298-490, 2006.

RAWAL, S. Y. *et al.*, **Periodontal and oral manifestations of marijuana use**. Journal of the Tennessee Dental Association. v. 92, pp. 26-31, 2014.

REDDY, S.; KAUL, S.; AGRAWAL, C. *et al.* **Periodontal status among substance abusers in indian population**. International Scholarly Research Network. ISRN Dentistry. v. 2012, n. 460856. pp 1-6. 2012.

REHM, J. *et al.* **Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders**. The Lancet, Amsterdam: Elsevier. v.373, n. 9682, pp. 2223-33, 2009.

RIBEIRO, E.D.P, OLIVEIRA, J.A. de; ZAMBOLIN, A.P.; LAURIS, J.R.P.; TOMITA, N.E. **Abordagem integrada da saúde bucal de droga-dependentes em processo de recuperação**. Revista de Pesquisa Odontológica Brasileira. v.16, n.3, pp. 239-45, 2002

ROSSI, L.; CASTRO, I.A. ; TIRAPGUI, J. **Biodiponibilidade de proteínas** ; 3ªed Barueri –SP,ed.Manole, v.6, pg.89-93, 2009.

SAINI, G.K. ; GUPTA, N.D.; PRABHAT, K.C. **Drug addiction and periodontal diseases**. Journal Indian Society Periodontology. v.17, n.5, pp.587–91, Sep/Oct, 2013.

SANCHEZ *et al.* **Relationship between salivary mucin or amylase and the periodontal status**. Journal of Oral Disease. v.19, pp. 585-91, 2013

SCHULZ-KATTERBACH, M.; IMFELD, T., IMFELD, C. **Cannabis and caries - does regular cannabis use increase the risk of caries in cigarette smokers?** Schweiz Monatsschr Zahnmed. v.119, n.6, pp. 576-83, 2009

SCIVOLLETO, S., MALBERGIER, A. **Etanol**. In: Oga, S. Fundamentos de toxicologia. 2a. ed. São Paulo: Atheneu; p.272-85, 2003..

SCULLY, C. ; EPSTEIN, J. B. **The role of saliva in oral health and the causes and effects of xerostomia**. Journal of Cannadian Dentistry Association, Ottawa. v. 58, n. 3, pp. 217-21, 1992.

SHEN, H. M., KENNEDY, J. L., OU, D. W. **Inhibition of cytokine release by cocaine.** International Journal of Immunopharmacological. v.16, pp. 295-300, 1994.

SHETTY,V.; MOONEY, L.J.; *et al*, **The relationship between methamphetamine use and increased dental disease.** The journal of the american dental association. v.141, n.3, pp. 307-18, March, 2010.

SINGER, D. L.; KLEINBERG, I. **Ammonia and urea content of human incisor tooth plaque.** Archives of Oral Biology. v.23, pp.1083-7, 1978.

SIQUEIRA, W. L.; SALIH, E.; WAN, D. L., *et al*. **Proteome of human minor salivary gland secretion.** International Journal of Dentistry Research. v.87, pp.445-50, 2008.

SLOTS, J., GENKO, R. J. **Black-pigmented Bacteroides species , Capnocytophaga species and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human disease: Virulence factors in colonization, survival and tissue destruction.** International Journal of Dentistry Research. v.63, pp.412-21, 1984.

SMITH, P. M. **Mechanisms of salivary secretion.** In: EDGAR, M., DAWES, C., O'MULLANE, D. Saliva and oral health. 3a ed. London: BDJ Books. v.9., pp. 14-31, 2004.

SMITH, G. W., FARREL, M., BUNTING, B. P., HOUSTON, J. E., SHEVLIN, M. **Patterns of polydrug use in Great Britain: findings from a national household population survey.** Journal of Drug Alcohol Dependence. v.113, pp. 222-8, 2011.

SOUZA, L. R. P. **A química forense na detecção de drogas de abuso** e-mail: luanarsp@hotmail.com. Dissertação (Mestrado em Química Forense) – Universidade de Brasília, 2007.

SREEBNY, L. M. **Saliva in health and disease: an appraisal and update,** International Dentistry Journal. v.50, pp. 140–161, 2000.

STRECKFUS, C. F.; BIGLER, L. R. **Salivary glands an saliva: saliva as a diagnostic fluid.** Oral diseases Houndmihs. v.8, n. 3, pp. 69-76, 2002.

SUDDICK, R. P.; HYDE, R. J.; FELLER, R. P. **Saúde bucal, água, eletrólitos salivares.** In: Menaker,L; Marhart, RE; Navia JM. Cárie Dentária- bases biológicas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan,v.8, pg. 118-131, 1984.

SWENDSEN, J.; CONWAY, K. P.; DEGENHARDT, L.; GLANTZ, M.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R., *et al.* **Mental Disorders as Risk factors for Substance Use, Abuse and Dependence: Results from the 10-year Follow-up of the National Comorbidity Survey.** *Addiction Journal*. v.105, pp.1117-28, 2010.

TAPERT, S. F. *et al.* **Blood oxygen level dependent response and spatial working memory in adolescents with alcohol use disorders.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, Hoboken [EUA]: Wiley-Blackwell; Austin: Research Society on Alcoholism (RSA). v.28, n.10, pp. 1577-86, Oct., 2004.

TEIXEIRA, A. N. **Avaliação da saúde bucal em usuários de cocaína e crack em 3 áreas de Salvador.** Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade de Taubaté.. pp.1-96, 2009.

TENOVUO, J., LAGERLÖF, F. **Saliva.** In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. v.4, 2ª. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, pg.17-43, 1995.

TOMASSI, G.; KREIDER, R. B. **Phosphorus – an essential nutrient for human diet.** *Imphos Newsletter*. v.16, pp. 1, 2002.

TRAEBERT, J.; MOREIRA, E. A. M. **Transtornos alimentares de ordem comportamental e seus efeitos sobre a saúde bucal na adolescência.** *Revista de Pesquisa Odontológica Brasileira*. v. 15, pp. 359-63, 2001.

TURNER, R. J.; SUGIYA, H. **Understanding salivary fluid and protein secretion.** *Journal of Oral diseases*. v.8, pp.3-11, 2002.

UHART, M.; WAND, G.S.. **Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research.** *Addict Biology Journal*. v. 14, pp.4364, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos.** Curitiba: Editora UFPR. Normas para apresentação de documentos científicos, 2000.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) World Drug Report, United Nations Office on Drugs and Crime, Sandeep Chawla, 2011

WOOD, R. W., SHOJA, I. E. J., FANG, C. P., GRAEFE, J. F.. **Methylecgonidine coats the crack particle.** *Pharmacological Biochemistry Behavior*. v.53, n.1, pp.57-66, Jan., 1996.

WOYCEICHOSKI, I. E., ARRUDA, E. P., RESENDE, L. G., MACHADO, M. A., GRÉGIO, A. M., AZEVEDO, L. R., LIMA, A. A. **Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa.** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiologica Endodontic. v.105, n.6, pp.745-9, Jun.,2008.

WOYCEICHOSKI, I. E. *et al.* **Salivary buffer capacity, pH, and stimulated flow rate of crack cocaine users.** Journal Investigative Clinical Dentistry. 2013. (No prelo).

VASICA, G., TENNANT, C.C. **Cocaine use and cardiovascular complications.** Medical Journal Australian. v.177, n.5, pp. 260-2, 2002.

WEISS, R.D.; MIRIN, S.M.; BARTEL, R.L. **Cocaine.** American Psiquiatric Press - Washington DC, 2^a ed. v. 2, pp.2-35, 1994.

ZIEDONIS, D.M., KOSTEN, T.R. **Pharmacotherapy improves treatment outcome in depressed cocaine addicts.** Journal of Psychoactive Drugs, v.23, n.4, pp.417-25, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Willian Augusto Gomes de Oliveira Bellani e Antonio Adilson Soares de Lima, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o senhor, a participar de um estudo intitulado “ Níveis de ansiedade, depressão, qualidade de vida e de cortisol salivar em alcoólatras e usuários de drogas ilícitas”.Esta pesquisa é importante para que se possa estudar e conhecer novas alternativas para a prevenção das lesões bucais em usuários de drogas ilícitas e alcoólatras.

- a) O objetivo desta pesquisa é comparar a concentração de dois componentes orgânicos(proteínas totais e uréia)e dois componentes inorgânicos(cálcio e fósforo) presentes na saliva estimulada coletada em indivíduos alcoólatras e usuários de drogas ilícitas com indivíduos não dependentes químicos (ADENDO).
- b) Caso você participe dessa pesquisa, será necessário responder a dois questionários e coletarmos um pouco de sua saliva. Para tal, será oferecido um pedacinho de borracha amarrado em fio dental para que você mastigue, e assim estimule a masigação. À medida que a saliva foi se acumulando na sua boca,o senhor vai ser orientado a cuspi-la num copo de plástico durante um período de 5 minutos. Em seguida, as amostras de saliva serão transferidas para um recipiente específico e analisadas em laboratório.
- c) O procedimento de coleta de saliva não levará mais do que 10 minutos pois envolve uma explicação do que será realizado a coleta de saliva, conforme descrito no item b. Além disso, haverá a necessidade do preenchimento de um questionário relacionado com sua qualidade de vida, dos níveis de ansiedade,depressão e das condições de sua saúde bucal por mais 20 minutos.
- d) A coleta da saliva será sempre realizada uma única vez e no próprio institute de pesquisa e Tratamento para o alcoolismo – IPTA.
- e) É possível que o senhor experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao fato de não gostar do sabor da borracha que precisará mastigar.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e / ou responsável legal_____

Pesquisador responsável_____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone(41) : 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

f) Todos os possíveis riscos que envolvam a sua participação neste estudo estão sendo minimizados, pois, preconizamos as seguintes medidas: a) O senhor será entrevistado em uma sala privada no momento de responder aos questionários e na coleta da saliva; b) A realização do exame clínico bucal será feita por um profissional treinado e que fará uso de material limpo, estéril e descartável; c) O pedaço de borracha usado para estimular a sua salivação é de consistência bem mole e que não é capaz de provocar danos aos seus dentes e aos tecidos moles da sua boca; e d) Caso você tenha algum ferimento na boca, a coleta da saliva só será realizada quando esta ferida estiver curada. Eventualmente, o senhor terá que repetir a coleta, caso venha a engolir a saliva ao invés de cuspi-la. Além disso, o seu nome não será revelado em nenhum momento da pesquisa, por isso todas as fichas serão codificadas.

g) Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

1. O senhor e a sociedade serão beneficiados. Uma vez que todos os examinados que apresentarem qualquer alteração bucal pelo examinador (doença cárie, doença periodontal, alterações de mucosa e lábios e ausência de dentes) serão informados encaminhados à clínica de Semiologia da UFPR para o tratamento mais adequado. Quando percebido níveis elevados de ansiedade e depressão entre os participantes, os mesmos serão informados e orientados a buscar aconselhamento com os psicólogos da instituição (IPTA). Para a sociedade, poderemos compreender melhor qual é a relação da saúde bucal, da ansiedade, da depressão e da qualidade de vida em usuários de drogas ilícitas e álcool internados para reabilitação.

h) Os pesquisadores: William Augusto Gomes de Oliveira Bellani, Cirurgião Dentista, mestrando em Odontologia da UFPR. Contato: william.bellani@gmail.com e Antonio Adilson Soares de Lima, Cirurgião Dentista, Docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPR. Contato: (41) 3360-4134, antollima@hotmail.com responsáveis por este estudo poderão ser contatados em horário comercial para esclarecer eventuais dúvidas que o senhor possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

k) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de um possível atendimento e/ou tratamento na Clínica Odontológica da UFPR, que está assegurado, se necessário.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (William Augusto Gomes de Oliveira Bellani, Antonio Adilson Soares de Lima e Docentes do Programa de Pos-Graduação em Odontologia da UFPR). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que será encaminhado para a clínica de Odontologia da UFPR para resolver os problemas bucais identificados, tais como: lesão de cárie, doenças nas gengivas, lesões na mucosa da boca, próteses mal adaptadas.

n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios e os tratamentos alternativos caso haja alguma alteração bucal. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento caso seja encontrada alguma alteração bucal. Fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item m.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

_____, ____/____/____

Local e Data.

Assinatura do Pesquisador

ANEXOS

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE/ SCS - UFPR

**PROJETO DE PESQUISA**

Título: NÍVEIS DE ANSIEDADE, DEPRESSÃO, QUALIDADE DE VIDA E DE CORTISOL SALIVAR EM ALCOÓLATRAS E USUÁRIOS DE DROGAS ILÍCITAS.

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01100912.4.0000.0102

Pesquisador: WILLIAM AUGUSTO GOMES DE OLIVEIRA
BELLANI

Instituição: Universidade Federal do Paraná - Setor de
Ciências da Saúde/ SCS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 84071

Data da Relatoria: 15/08/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de protocolo de tese de mestrado, reapresentado por pendências a serem avaliadas.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL - Avaliar os níveis de ansiedade, depressão, qualidade de vida e de cortisol salivar em indivíduos usuários de drogas ilícitas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS - Estimar os níveis de ansiedade em usuários de drogas ilícitas (cocaína, maconha e crack); Avaliar os níveis de depressão em usuários de drogas ilícitas (cocaína, maconha e crack); Analisar os níveis de qualidade de vida em usuários de drogas ilícitas (cocaína, maconha e crack); Dosar os níveis de cortisol salivar de usuários de drogas ilícitas (cocaína, maconha e crack).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores informam as medidas que serão tomadas visando a minimização dos riscos e desconfortos do estudo, como entrevista em uma sala privada no momento de responder aos questionários e na coleta da saliva; a realização do exame clínico bucal por um profissional treinado e que fará uso de material limpo, estéril e descartável; e a preservação da confidencialidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos e documentos apresentados estão em conformidade com o exigido pelo CEP/SD.

Recomendações:

O Pesquisador deverá solicitar carimbo de aprovação no termo de consentimento Livre e esclarecido, junto a Secretaria do CEP/SD, antes da sua aplicação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam às pendências apontadas pelo relator. Em carta resposta ao relator do protocolo, os pesquisadores informam que a interpretação dos resultados referentes aos níveis de cortisol será feita no laboratório de Patologia Aplicada do Departamento de Estomatologia da UFPR, pelo mestrando e seu orientador. Da mesma forma, a avaliação de riscos/benefícios e desconfortos encontra-se agora redefinida e adequada. O tempo necessário para todo o procedimento - acúmulo e coleta da saliva e resposta ao questionário está agora bem especificado e chega a aproximadamente 35 minutos.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE/ SCS - UFPR



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Pendências atendidas.

CURITIBA, 28 de Agosto de 2012

Assinado por:
Claudia Seely Rocco

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO II – BULA DO KIT PARA LEITURA DA URÉIA SALIVAR

URÉIA UV Liquiform

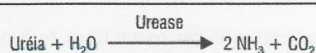
Instruções de Uso

Ref.: 104
MS 10009010020

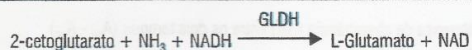
Finalidade . Sistema enzimático para determinação da uréia no soro, plasma e urina por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos (tempo fixo).

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . A uréia é hidrolisada pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono.



A amônia reage com o 2-cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase (GLDH), promovendo a oxidação do NADH a NAD. A consequente redução da absorbância medida em 340 nm é proporcional à concentração de uréia na amostra.



Características do sistema . Existem vários métodos para determinação da uréia, mas os que utilizam acoplamento de enzimas são mais convenientes e extensivamente usados nos laboratórios clínicos.

O sistema apresenta uma linearidade até 300 mg/dL reduzindo-se acentuadamente a repetição de testes em valores elevados. O produto da Labtest não sofre interferências provocadas por valores medianamente elevados de bilirrubina, hemoglobina e triglicérides.

As substâncias utilizadas na reação se encontram distribuídas adequadamente em dois reagentes, para conferir maior estabilidade na forma líquida original e manutenção das condições ótimas da reação, permitindo a utilização direta dos reagentes em sistemas automáticos.

A metodologia mono-reagente pode ser aplicada utilizando um Reagente de Trabalho estável 28 dias sob refrigeração, obtendo-se desempenho adequado mesmo em situações de baixas demandas do teste. O sistema permite, ainda, preparar o volume de Reagente de Trabalho necessário para apenas uma medição da concentração da uréia.

O método é facilmente aplicado em sistemas automáticos e semi-automáticos capazes de medir absorbância em 340 nm.

Metodologia . Enzimático UV.

Reagentes

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.
Contém tampão 20 mmol/L, pH 10,0; 2-cetoglutarato 16 mmol/L; NADH 300 µmol/L; azida sódica 30,8 mmol/L e surfactante.

2. [R2] - Reagente 2 - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Contém tampão 380 mmol/L, pH 8,0; urease ≥50000 U/L; GLDH ≥3750 U/L; azida sódica 14,6 mmol/L, conservante e surfactante.

3. [CAL] - Padrão - Armazenar entre 2 - 30 °C

Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém uréia 70 mg/dL e azida sódica 7,7 mmol/L.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Rastreabilidade do sistema . O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 912 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Sugerimos utilizar calibradores protéicos para a calibração de sistemas automáticos. Os produtos da linha Calibra - Labtest têm concentrações de uréia rastreáveis ao SRM 912 do NIST.

Precauções e cuidados especiais

Não utilizar o Reagente de Trabalho quando sua absorbância medida contra a água em 340 nm for igual ou menor que 1,0 ou quando se mostrar turvo ou com sinais de contaminação.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente.

Os reagentes e o padrão contêm azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e, no caso de contato com os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Material necessário e não fornecido

1. Fotômetro com cubeta termostaticada capaz de medir com exatidão a absorbância em 340 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Influências pré-analíticas. A contaminação da água, vidraria e ambiente com amônia podem produzir resultados falsamente elevados. Evitar fumar próximo ao local das medições.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Usar soro ou plasma (fluoreto, heparina, EDTA) e urina. Não usar anticoagulantes contendo amônia. A concentração de fluoreto na amostra não deve ser maior que 3 mg/mL pois o fluoreto em altas concentrações é inibidor da urease.

O uso do anticoagulante Glistab (Labtest Ref.: 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de uréia, glicose e creatinina.

O analito é estável no soro ou plasma por 12 horas entre 15 - 25 °C e 3 dias entre 2 - 8 °C. Não utilizar amostras mostrando sinais de contaminação microbiana.

A urina de 24 horas deve ser colhida em frasco contendo 2,0 mL de HCl a 50% (v/v) e centrifugada antes de usar.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitam infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de bilirrubina até 20 mg/dL, hemoglobina até 300 mg/dL e triglicérides até 1800 mg/dL não produzem interferências significativas.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm, acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\begin{aligned}\text{Hemoglobina (mg/dL)} &\equiv \text{Absorbância}_{405} \times 601 \\ \text{Hemoglobina (mg/dL)} &\equiv \text{Absorbância}_{415} \times 467\end{aligned}$$

Preparo do reagente de trabalho. O conjunto de um frasco de Reagente 1 e um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Transferir o conteúdo de um frasco de Reagente 2 para um frasco de Reagente 1 e homogeneizar por inversão. Anotar a data de expiração.

Estável 2 dias entre 15 - 25 °C e 28 dias entre 2 - 8 °C quando não houver contaminação química ou microbiana. Identificar o frasco do Reagente de Trabalho para evitar confusão com outros frascos do Reagente 1.

Para preservar o desempenho, o reagente deve permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta.

Opcionalmente, pode-se preparar menor volume do Reagente de Trabalho utilizando a proporção de 4 (quatro) volumes do Reagente 1 e 1 (um) volume do Reagente 2.

O Reagente de Trabalho contém tampão 76 mmol/L, pH 8,0; NADH 240 μmol/L; urease ≥10000 U/L; glutamato desidrogenase ≥750 U/L; 2-cetoglutarato 12,8 mmol/L e azida sódica 27,5 mmol/L.

Procedimento

Ver precauções e cuidados especiais.

Para a dosagem de uréia na urina, diluir a amostra 1:50 (0,1 mL de urina + 4,9 mL de água destilada ou deionizada). Multiplicar o resultado obtido por 50.

1. Ajustar a temperatura do fotômetro para 37 ± 0,2 °C e o comprimento de onda em 340 nm. Acertar o zero com água deionizada.

2. Em um tubo rotulado "Teste" ou "Padrão" colocar 1,0 mL do Reagente de Trabalho e incubar à temperatura de trabalho durante 1 minuto.

3. Adicionar 0,01 mL de Amostra ou Padrão, misturar e transferir imediatamente para cubeta termostaticada a 37 ± 0,2 °C.

4. Disparar o cronômetro e medir a absorbância aos 30 e 90 segundos.

5. Usar a diferença de absorbância (ΔA) entre os dois tempos (A₃₀ - A₉₀) para calcular os resultados.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente, mantendo-se a relação amostra/reagente 1:101, sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ Teste}}{\Delta A \text{ Padrão}} \times 70$$

Exemplo

A ₃₀ Teste = 1,780	A ₃₀ Padrão = 1,710
A ₉₀ Teste = 1,710	A ₉₀ Padrão = 1,596
ΔA Teste = 1,780 - 1,710	ΔA Padrão = 1,710 - 1,596
ΔA Teste = 0,070	ΔA Padrão = 0,114

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{0,070}{0,114} \times 70 = 43$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{70}{\Delta A \text{ Padrão}}$$

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \Delta A \text{ Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{70}{0,114} = 614$$

$$\text{Uréia (mg/dL)} = 0,070 \times 614 = 43$$

$$\text{Uréia em urina (mg/24 horas)} = \frac{\text{mg/dL} \times \text{volume (mL)}}{100}$$

Calibração

O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 912 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Calibrações Manuais

Obter semanalmente o fator de calibração.

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas Automáticos

Branco de reagentes: água ou solução de NaCl 150 mmol/L (0,85%);
Padrões: usar calibradores protéicos. As concentrações de uréia nos produtos da linha Calibra - Labtest são rastreáveis ao SRM 912 do NIST.

Intervalo de calibrações

Deve-se recalibrar o sistema semanalmente e nas seguintes situações:
Calibração de 2 ou 3 pontos ao mudar de lote;
Calibração de 2 ou 3 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 300 mg/dL. Para valores maiores, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade. O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração. Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e o erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB)^{4,6}.

Intervalo de referência. Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, seus próprios intervalos de referência.

Soro ou Plasma

Crianças e Adolescentes ⁷	
Idade	mg/dL
1 dia a 12 meses	2 a 34
1 a 13 anos	8 a 36

Soro ou Plasma

Idade	mg/dL
Adultos	15 a 45

Urina: (Todas as Idades): 26 a 43 g/24 horas

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,166 = Unidades SI (mmol/L)

Características do desempenho⁸

Exatidão. Em duas amostras com concentrações de uréia iguais a 37 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito obtendo-se recuperações entre 95 e 98%.

Os erros sistemáticos proporcionais estimados nos níveis de decisão de 56 mg/dL e 107,0 mg/dL são 1,9 mg/dL e 3,6 mg/dL, respectivamente.

Especificidade. O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 20 amostras com valores situados entre 16 e 327 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão $y = 0,975x + 2,17$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,999. O erro sistemático médio é igual a 1,4% no nível de decisão 56,0 mg/dL e 0,5% no nível de decisão 107 mg/dL. O método Labtest é substancialmente equivalente ao método comparativo. O coeficiente de correlação (0,999) confirma a força da relação entre os métodos.

Repetitividade - imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	57	0,77	1,36
Amostra 2	20	114	1,29	1,13

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	57	0,97	1,71
Amostra 2	20	114	2,90	2,53

O erro total (erro aleatório + erro sistemático) estimado em um nível de decisão igual a 56 mg/dL é 2,5 mg/dL ou 4,2% e em um nível de decisão igual a 107 mg/dL é 5,0 mg/dL ou 4,7%. O resultado indica que o método atende à especificação para erro total ($\leq 15,7\%$) baseada nos componentes da VB.

Sensibilidade metodológica. Uma amostra protéica não contendo uréia foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado valor igual a 0,94 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorvância do padrão como parâmetro, verificou-se que a sensibilidade fotométrica é 0,64 mg/dL, correspondendo a uma diferença de absorvância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz. Duas amostras com valores iguais a 355 e 360 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 4 foram encontradas recuperações entre 110,5 e 111,4%. Os erros sistemáticos encontrados são significativamente menores que o erro total da especificação baseada nos componentes da VB.

Significado clínico. A uréia se eleva fisiologicamente devido a dieta hiperprotéica ou com a idade. Sua diminuição ocorre na gravidez normal e nos indivíduos em dietas com baixo valor protéico e alto conteúdo de carboidratos. Elevações da uréia ocorrem também por catabolismo elevado (febre, septicemia) e hemorragia interna.

A diminuição da uréia, que não tem expressão clínica, pode ocorrer também na soroterapia com carboidratos devido a problemas de diluição, redução do catabolismo protéico e aumento da diurese.

Elevações da uréia por defeitos de excreção se devem a causas pré-renais (insuficiência cardíaca congestiva), causas renais (nefrites, pielonefrites e insuficiência renal aguda ou crônica). As causas pós-renais ocorrem nas obstruções das vias urinárias (cálculos, carcinomas ou pólipos).

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar <www.fxol.org/>.

Referências

1. Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis, vol 8, 3ª ed, Deerfield Beach: Verlag Chemie, 1985; 444-49.
2. Hallet CJ, Cook JGM. Clin Chim Acta 1971;35:37.
3. Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott, Laboratories, Diagnostics Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
4. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponível em: <<http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170>> (acesso em 04/2006).
5. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.
6. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.
7. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC. Pediatric Reference Ranges, 5a. edição, Washington: AACC Press, 2005:195-196.
8. Labtest: Dados de arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Ureia UV Liquiform	104-4/50	R11 4 x 40 mL
		R12 4 x 10 mL
		CAL 1 x 5 mL
	104-2/250	R11 2 x 200 mL
		R12 2 x 50 mL
		CAL 1 x 5 mL

O volume por teste em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação de cada equipamento.

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semi-automáticos.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.



ANEXO III – KIT PARA LEITURA DO CÁLCIO SALIVAR

CÁLCIO Liquiform

Instruções de Uso

Ref.: 90
MS 10009010067

Finalidade. Sistema para a determinação do cálcio por reação de ponto final em amostras de sangue e urina.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio. O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino formando um complexo de cor violeta que é medido em 570 nm.

Características do sistema. As medições fotométricas do cálcio em soro e urina através de métodos diretos estão baseadas na formação de complexos com moléculas orgânicas. Dentre os compostos que reagem com o cálcio, a cresolftaleína complexona é um dos mais frequentemente utilizados na rotina dos laboratórios clínicos. Nos levantamentos do Colégio de Patologistas Americanos realizados no ano de 1999, 46% dos participantes utilizaram reagentes contendo a cresolftaleína complexona.

O sistema da Labtest utiliza soluções líquido estáveis que permitem a produção de reagente único, estável 8 horas entre 15 - 25 °C e possibilita utilizar uma reação direta, rápida e que não sofre interferência de valores da bilirrubina até 38 mg/dL, hemoglobina até 180 mg/dL e triglicérides até 900 mg/dL. Assim, como valores de bilirrubina superiores a 38 mg/dL não são frequentes e a presença da hemoglobina é facilmente prevenida por uma adequada colheita da amostra, a utilização do branco da amostra será aplicada em um número reduzido de amostras.

O método não sofre interferências das proteínas plasmáticas e o efeito do magnésio é eliminado pela adição de 8-hidroxiquinoleína, tornando o método um dos mais específicos para a determinação do cálcio.

O sistema é facilmente aplicável em analisadores automáticos e semi-automáticos capazes de realizar uma medição de ponto final entre 550 e 590 nm.

Metodologia. CPC.

Reagentes

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C.
Contém tampão 920 mmol/L, pH 12.

2. [R2] - Reagente 2 - Armazenar entre 2 - 8 °C.
Contém o-cresolftaleína complexona 320 µmol/L, 8-hidroxiquinoleína 13 mmol/L e ácido clorídrico 130 mmol/L.

3. [CAL] - Padrão - Cálcio 10 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C.
Contém formol 0,1%. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Não utilizar o Reagente de Trabalho quando sua absorbância, medida contra a água em 570 nm for $\geq 0,750$ ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação. Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente.

Material necessário e não fornecido

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância entre 550 e 590 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.

Influências pré-analíticas. O exercício físico aumenta o valor do cálcio em 3-5%.

A concentração do cálcio diminui cerca de 10% na gravidez.

Os valores do cálcio estão ligeiramente reduzidos no alcoolismo crônico e ligeiramente aumentados após hemodiálise.

Amostra

Soro ou plasma (heparina) e urina.

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Devido ao aumento da permeabilidade das hemácias ao cálcio, separar o soro ou plasma até uma hora após a colheita. O analito é estável até 2 semanas entre 2 - 8 °C e 4 semanas a 10 °C negativos.

Colher a amostra de urina em um frasco contendo 20 mL de HCl 6 mol/L (50% V/V). Durante a colheita, a amostra deve ser bem homogeneizada.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitam infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Plasmas citratados, oxalatados, fluoretados ou com EDTA fornecem resultados falsamente diminuídos porque formam complexos estáveis com o cálcio.

Valores de bilirrubina até 38 mg/dL, hemoglobina até 180 mg/dL e triglicérides até 900 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de triglicérides acima de 900 mg/dL produzem resultados falsamente elevados por interferência fotométrica.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \equiv \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \equiv \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Minimização da ação de interferentes. Para amostras com valores de bilirrubina acima de 38 mg/dL, hemoglobina acima de 180 mg/dL e triglicérides acima de 900 mg/dL, utilizar o seguinte procedimento: em duas cubetas marcadas "Branco" e "Teste" pipetar 1,0 mL do Reagente de Trabalho e adicionar 0,02 mL da amostra ao tubo teste, misturar e ler em 570 nm acertando o zero com o branco. Adicionar 0,02 mL de Hemstab - Labtest (Ref.: 30) aos tubos "Branco" e "Teste". Misturar e ler em 570 nm acertando o zero com o branco. Usar a diferença entre as duas leituras do teste para calcular o resultado.

Preparo do reagente de trabalho. Misturar 3 volumes do Reagente 1 com 1 (um) volume do Reagente 2 de acordo com o número de testes. Estável 8 horas entre 15 - 25 °C. O Reagente de Trabalho apresenta coloração violeta com absorbância em torno de 0,500. Este fato não compromete o desempenho do reagente.

O CO₂ atmosférico altera significativamente a estabilidade do Reagente 1 e do reagente de trabalho, quando os reagentes são mantidos em recipientes abertos. A modificação da estabilidade é influenciada pelo tempo de exposição e condições ambientais. Sugerimos manter na bandeja do analisador somente o volume suficiente para a realização de uma corrida analítica ou usar as informações do controle da qualidade como indicador da necessidade de realizar nova calibração.

O Reagente de Trabalho contém tampão 700 mmol/L, o-cresolftaleína 80 µmol/L, 8-hidroxiquinoleína 3,4 mmol/L, ácido clorídrico 32 mmol/L.

Procedimento

Ver observações 1, 2 e 3.

Este procedimento elimina a interferência causada por traços de cálcio presentes na vidraria.

Dosagem na urina. Quando a amostra de 24 horas não for acidificada durante a colheita, adicionar 20 mL de HCl 6 mol/L, misturar, esperar 60 minutos e tomar a alíquota para o ensaio. A amostra previamente acidificada deve ser bem misturada antes de usar.

Tomar 2 cubetas do fotômetro, rotular "Teste" e "Padrão" e proceder como a seguir.

	Teste	Padrão
Reagente de Trabalho	1,0 mL	1,0 mL

Colocar o fotômetro em 570 nm ou filtro verde laranja (550 a 590).

Tomar a cubeta "Teste" e acertar o zero do instrumento. Em seguida, sem movimentar os controles do instrumento, adicionar 0,02 mL da amostra nesta cubeta. Misturar bem e determinar a absorbância (A_{teste}).

Tomar a cubeta "Padrão" e acertar o zero do instrumento. Em seguida, sem movimentar os controles do instrumento, adicionar 0,02 mL de padrão nesta cubeta. Misturar bem e determinar a absorbância (A_{padrão}).

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado.

Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos. Ver linearidade.

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 10$$

Exemplo

Absorbância do teste: 1,270
Absorbância do padrão: 1,346

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = \frac{1,270}{1,346} \times 10 = 9,4$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de calibração} = \frac{10}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator de calibração} = \frac{10}{1,346} = 7,43$$

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = 1,270 \times 7,43 = 9,4$$

$$\text{Cálcio urinário (mg/dL)} \times \text{volume urinário (mL)} \\ \text{Cálcio urinário (mg/24 horas)} = \frac{\text{Cálcio urinário (mg/dL)} \times \text{volume urinário (mL)}}{100}$$

Cálcio por volume de filtrado glomerular. O cálcio urinário (CaU) dosado em uma amostra de urina pode ser relacionado ao volume do filtrado glomerular (FG). Esta relação é uma alternativa para obter valores da calciúria quando a amostra de 24 horas não estiver disponível. Obter uma amostra de sangue e urina após jejum de 8 horas. Realizar as dosagens de cálcio e creatinina na urina e creatinina no soro e aplicar na seguinte fórmula:

$$\text{Ca (mg/100 mL de FG)} = \frac{\text{CaU (mg/dL)} \times \text{creatinina sérica (mg/dL)}}{\text{Creatinina urinária (mg/dL)}}$$

Calibração. O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 915 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes;
Obter o fator quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água ou solução de NaCl 150 mmol/L (0,85%);
Padrões: usar calibradores protéicos. As concentrações de cálcio na linha Calibra Labtest são rastreáveis ao SRM 915b do NIST;

Intervalo de calibrações

Deve-se recalibrar o sistema nas seguintes situações:
Calibração de 2 ou 3 pontos ao mudar de lote;
Calibração de 2 ou 3 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 16 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 16 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade. O laboratório deve manter um programa de controle da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de controle, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e/ou desvios da calibração. Sugere-se procurar atender como limites máximos de controle, especificações de coeficiente de variação, erro sistemático (bias) e erro total capazes de identificar a ocorrência de erros de importância médica.

Cálcio Ionizado (CaI)

$$\text{CaI (mg/dL)} = \frac{6 \times \text{Ca} - \frac{(0,19 \times \text{P}) + \text{A}}{3}}{(0,19 \times \text{P}) + \text{A} + 6}$$

Ca = Cálcio sérico (mg/dL)

P = Proteína total (g/dL)

A = Albumina (g/dL)

Intervalo de referência. Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência na população atendida.

Soro

Cálcio

Crianças ^{7,8}	
Idade	mg/dL
Cordão Umbilical	8,2 a 11,2
Prematuros	6,2 a 11,0
0 a 10 dias	7,6 a 10,4
Lactentes	9,0 a 11,0
2 a 12 anos	8,8 a 10,8

Cálcio

Adultos	mg/dL
	8,8 a 11,0

Cálcio Iônico (mg/dL)

1 a 18 anos ^{7,8}	4,80 a 5,52
Adultos	4,60 a 5,40

Urina

5 a 40 mg / 24 horas em dieta isenta de cálcio.
Até 200 mg / 24 horas em dieta restrita de cálcio (500 mg / 24 horas).
Até 300 mg / 24 horas em dieta sem restrição de cálcio.

Amostra de urina: <0,16 mg / 100 mL de FG.

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) X 0,25 = Unidades SI (mmol/L).

Características do desempenho⁹

Exatidão. Em duas amostras com concentrações de cálcio iguais a 7,0 e 13,0 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito obtendo-se recuperações entre 104 e 111%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 11 mg/dL foi igual a 0,82 mg/dL ou 7,5%.

Especificidade. O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 60 amostras com valores situados entre 4,95 e 15,2 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 0,996x + 0,2$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,995. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão 11 mg/dL foi igual a 0,156 mg/dL ou 1,42%. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	10	6,48	0,064	1,0
Amostra 2	10	9,88	0,072	0,72
Amostra 3	10	11,92	0,072	0,60

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	10	6,52	0,088	1,34
Amostra 2	10	9,80	0,096	0,98
Amostra 3	10	11,88	0,108	0,91

Sensibilidade metodológica. Uma amostra protéica não contendo cálcio foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 0,1 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 0,06 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,0001.

Efeitos da diluição da matriz. Duas amostras com valores iguais a 15,7 e 17,0 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8 encontrou-se recuperações entre 91 e 99%.

Significado clínico. O cálcio sérico é mantido dentro dos limites fisiológicos pela ação combinada do paratormônio e vitamina D através de seus efeitos sobre os ossos, intestinos e rins.

Na maioria das vezes a hipercalemia indica a presença de hiperparatireoidismo ou de doenças malignas. A hipercalemia está associada ao uso de drogas como os tiazídicos, vitaminas A e D, antiácidos alcalinos e carbonato de lítio. A imobilização (fraturas), doença de Paget e doenças granulomatosas (sarcoidose) são causas de hipercalemia.

As causas mais comuns de hipocalcemia são: hipoparatiroidismo idiopático ou cirúrgico, pseudo-hipoparatiroidismo, insuficiência renal, desordens do metabolismo da vitamina D, deficiência de magnésio, drogas, tetania neonatal, pancreatite aguda, transfusões sanguíneas múltiplas.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. O uso de detergente iônico para a limpeza do material é uma fonte de contaminação com cálcio.

4. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3ª edição, Washington: AACC Press, 1990.

Referências

1. Bagisnki ES. Selected Methods of Clinical Chemistry 1982;9:125.
2. Connerty HV, Briggs AR. Am J Clin Pathol 1966;45:290.
3. Morin LG. Am J Clin Pathol 1974;61:114.
4. Pottgen P, Davis ER. Clin Chem 1976;22:1752.
5. Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
6. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.
7. Burtis CA, Ashwood ER. Textbook of Clinical Chemistry, 2a. edição, Philadelphia: W.B. Saunders, 1986:2175-2211.
8. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC. Pediatric Reference Ranges, 5a. edição, Washington: AACC Press, 2005: 45-46.
9. Labtest: Dados de arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Cálcio Liquiform	90-2/60	R11 2 x 45 mL
		R12 2 x 15 mL
		EAL 1 x 5 mL

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semi-automáticos.

O número de testes em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

ANEXO IV – KIT PARA LEITURA DO FÓSFORO SALIVAR

FÓSFORO

Instruções de Uso

Ref.: 42
MS 10009010008

Finalidade . Sistema para a determinação do Fósforo Inorgânico em amostras de sangue, urina e líquido amniótico com reação de ponto final.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . Os íons fosfato reagem com o molibidênio em meio ácido formando um complexo amarelo, o qual, por ação de um tampão alcalino, é reduzido a azul-molibidênio que é medido colorimetricamente.

Características do sistema . A Labtest desenvolveu um método rápido e simples para determinação direta do fósforo inorgânico. A introdução de um potente catalisador promove a rápida realização da dosagem. O redutor foi substituído pela hidroxilamina que não tem os inconvenientes de instabilidade dos outros redutores como o metol, ácido ascórbico e ANSA.

A interferência das proteínas é inibida pela solubilização em meio alcalino, que também acelera o desenvolvimento da cor.

O método proposto utiliza a técnica manual e é facilmente aplicável à maioria dos analisadores semi-automáticos e automáticos capazes de pipetar dois reagentes e medir com exatidão uma reação de ponto final entre 640 e 700 nm.

Metodologia . Fósforo Molibdato.

Reagentes

1. [R1] - Catalisador - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém polivinilpirrolidona e cloridrato de hidroxilamina 2,88 mol/L. Este reagente pode apresentar coloração de levemente amarelada a alaranjada.

2. [R2] - Reagente Molibdato - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém molibdato de amônio 41 mmol/L e ácido sulfúrico 900 mmol/L.

3. [R3] - Tampão - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém carbonato de sódio 50 mmol/L e hidróxido de sódio 10 mol/L.

4. [CAL] - Padrão 5,0 mg/dL - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado, entre 2 - 8 °C, para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação de reagentes. O Reagente Molibdato e o Tampão são cáusticos e podem produzir queimaduras. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com a pele e os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

O uso de detergente iônico para limpar o material é uma fonte de contaminação com íons de fósforo.

Ao usar os reagentes nº 1, 2 e 3, pingar as gotas diretamente na água destilada e não pela parede do tubo de ensaio. Usar o conta gotas exatamente na posição vertical.

É importante não trocar as tampas dos reagentes.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Material necessário e não fornecido

1. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorvância entre 640 e 700 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagente.
3. Cronômetro.

Influências pré-analíticas . Para controle terapêutico, é aconselhável colher a amostra sempre no mesmo horário, devido a variações circadianas do fósforo.

Encontram-se valores significativamente mais baixos durante o período menstrual e em pessoas obesas.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Usar soro ou plasma (heparina), urina e líquido amniótico. O soro ou plasma devem ser separados até uma hora após a colheita para minimizar a liberação do fósforo das hemácias. O analito é estável por 2 dias entre 15 - 25 °C e por uma semana entre 2 - 8 °C.

Plasmas citratados, oxalatados, fluoretados ou com EDTA, fornecem resultados falsamente diminuídos.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de Bilirrubina até 5 mg/dL e Triglicérides até 170 mg/dL não produzem interferências significativas.

Valores de Bilirrubina entre 5 e 38 mg/dL produzem resultados falsamente elevados.

Valores de Triglicérides entre 170 e 3500 mg/dL produzem resultados falsamente elevados por interferência fotométrica. A ação deste interferente pode ser minimizada com o uso do branco da amostra, que é aplicável para valores de Triglicérides até 900 mg/dL.

Amostras hemolisadas produzem resultados falsamente elevados, devido à contaminação do plasma ou soro com o fósforo das hemácias. Esta interferência não é corrigida utilizando o branco da amostra.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} = \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} = \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Minimização da ação de interferentes. Branco da Amostra: Misturar 2,5 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) com 0,1 mL da amostra. Medir a absorbância em 650 nm, acertando o zero com água destilada ou deionizada. Subtrair a absorbância assim obtida, da absorbância do teste e calcular a concentração. Este sistema de correção é aplicável apenas nos casos em que a amostra produz interferência fotométrica.

Procedimento

Ver observações 1 e 2.

Para a dosagem na urina, homogeneizar bem a amostra, separar 10 mL, e acertar pH entre 1 e 3 com HCl concentrado para dissolver os cristais de fosfato. Diluir a urina 1:10 (0,1 mL de urina + 0,9 mL de água destilada ou deionizada). Multiplicar o resultado obtido por 10.

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Água destilada ou deionizada	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Amostra	—	0,1 mL	—
Padrão (nº 4)	—	—	0,1 mL
Catalisador (Nº 1)	1 gota	1 gota	1 gota

Misturar.

Reagente Molibdato (nº 2)	1 gota	1 gota	1 gota
---------------------------	--------	--------	--------

Agitar fortemente (nesta fase ocorre turvação). Colocar em banho de água fria (20 - 25 °C) durante 3 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Tampão (nº 3)	2 gota	2 gota	2 gota
---------------	--------	--------	--------

Agitar fortemente e colocar em banho de água fria (20 - 25 °C) durante 5 minutos. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 650 nm ou filtro vermelho (640 a 700), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 15 minutos.

O branco é incolor. A presença de cor azulada visível no branco ocorre quando se usa água de qualidade inadequada.

A água deve ter uma resistividade ≥ 1 megaohm ou uma condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,5 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes, é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica.

Cálculos

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 5$$

Exemplo

$$\text{Absorbância do teste} = 0,216$$

$$\text{Absorbância do padrão} = 0,325$$

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \frac{0,216}{0,325} \times 5 = 3,3$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{5}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{Fator}$$

$$\text{Úrina (mg/24 horas)} = \frac{\text{mg/dL} \times \text{volume de 24 horas (em mL)}}{100}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{5}{0,325} = 15,38$$

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = 0,216 \times 15,38 = 3,3$$

Calibração . O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 186 I-F do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);

Padrões: usar calibradores protéicos. As concentrações de fósforo nos calibradores da linha Calibra Labtest são rastreáveis ao SRM 186 I-F do NIST.

Intervalo de calibrações:

Calibração de 2 ou 3 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 ou 3 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 14 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 14 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração.

Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e o erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB)^{7,8}.

Fosfolípidos . Em um tubo de centrífugador pipetar 2,7 mL de álcool isopropílico e adicionar 0,3 mL de soro gota a gota. Misturar bem e esperar 5 minutos. Centrifugar por 3 minutos.

Tomar 1,0 mL de sobrenadante límpido, colocar em tubo de ensaio e evaporar em banho fervente até secagem completa.

Aquecer em chama até haver clareamento total da mistura (5 minutos). Deixar esfriar.

Dosar o fósforo de acordo com o procedimento técnico, omitindo a etapa de colocação da amostra (0,1 mL).

$$\text{Fosfolípidos (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 125$$

Intervalo de referência . Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, seus próprios intervalos de referência.

Soro

Crianças e Adolescentes ⁹	
Idade	mg/dL
Até 10 dias	4,5 a 9,0
10 dias a 2 anos	4,5 a 6,7
2 a 12 anos	4,5 a 5,5
Maior que 12 anos	2,5 a 4,8

Soro

Adultos	
	mg/dL
	2,5 a 4,8

Urina . 340 a 1000 mg/24 horas.

A excreção de fosfato urinário varia com a idade, massa muscular, dieta, função renal, concentração de paratormônio e hora do dia.

Fosfolípidos (em lecitina) . 125 a 300 mg/dL

Conversão . Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,323 = Unidades SI (mmol/L).

Características do desempenho¹⁰

Exatidão . Em duas amostras com concentrações de fósforo iguais a 1,6 e 2,6 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito, obtendo-se recuperações entre 97 e 101%. O erro Sistemático proporcional médio obtido em um valor de 2,5 mg/dL, foi igual a 0,025 mg/dL ou 1,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método Molibdato UV, utilizando 80 amostras com valores situados entre 2,1 e 10,5 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 0,433 + 0,935x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,995. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (2,5 mg/dL), foi igual a 0,27 mg/dL ou 10%. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,8	0,02	1,2
Amostra 2	20	2,5	0,02	0,8
Amostra 3	20	4,8	0,03	0,5

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,8	0,03	1,8
Amostra 2	20	2,5	0,06	2,5
Amostra 3	20	4,7	0,18	3,9

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica não contendo fósforo foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio, tendo sido encontrado um valor igual a 0,13 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, o limite de detecção fotométrica é 0,015 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 12,8 e 15,4 mg/dL, foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8, encontrou-se recuperações entre 98 e 105%.

Significado clínico . Embora a insuficiência renal crônica e o hipoparatiroidismo sejam as duas causas mais comuns de hiperfosfatemia várias condições podem causar hiperfosfatemia transitória e assintomática.

Como o músculo se constitui no grande reservatório de fosfato é evidente que a rabdomiólise produz severa hiperfosfatemia.

Outras condições que promovem a liberação do fosfato intracelular e levam à hiperfosfatemia incluem a hipertermia maligna e a quimioterapia antitumoral.

A hiperfosfatemia pode ocorrer após administração de laxativos e enemas de retenção que contêm fosfato. Repetidos enemas contendo fosfato podem produzir hiperfosfatemia.

Níveis diminuídos de fósforo são encontrados no hiperparatiroidismo, na intoxicação pelo chumbo e na alimentação parenteral.

Observa-se discreta redução do fósforo sérico no último trimestre de gravidez.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes

em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar www.fbol.org.

Referências

1. Baginsk ES. Am J Med Tech 1969;35:475.
2. Fiske CH, Subarrow Y. J Biol Chem 1925;66:375.
3. Gomori G. J Lab Clin Med 1942;27:955.
4. Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
5. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Burtis CA, Ashwood ER eds, 2a edição, The W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1994
6. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR. Clin Chem 1981;27:493-501.
7. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponível em: <<http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170>> (acesso em 04/2006).
8. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.
9. Burtis CA, Ashwood ER. Textbook of Clinical Chemistry, 2a. edição, Philadelphia: W.B. Saunders, 1986:2175-2211.
10. Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Fósforo	42	R1 1 X 6 mL
		R2 1 X 6 mL
		R3 1 X 12 mL
		CAL 1 X 5 mL

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos.

Informações ao consumidor**[Termos e Condições de Garantia]**

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

